



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Infestação, perfil de suscetibilidade e diversidade genética de *Triatoma infestans*
em quatro comunidades do município de Toro Toro (Potosi-Bolívia).**

Por:

Jorge Espinoza Echeverria

Belo Horizonte

2017

TESE

DCS – IRR J. E. ECHEVERRIA

2017

**Infestação, perfil de suscetibilidade e diversidade genética de *Triatoma infestans*
em quatro comunidades do município de Toro Toro (Potosi-Bolívia).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra.Liléia Gonçalves
Diotaiuti

Belo Horizonte

2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

E185 i Echeverria, Jorge Espinoza.
2017

Infestação, perfil de suscetibilidade e diversidade genética de *Triatoma infestans* em quatro comunidades do município de Toro Toro (Potosi-Bolívia) / Jorge Espinoza Echeverria. – Belo Horizonte, 2017.

XVI, 96 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 79 - 91

Tese (Doutorado) – Teses para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. *Triatoma infestans* 2. Doença de Chagas/ infestação 3. resistência a inseticidas 4. Deltametrina I. Título. II. Diotaiuti, Liléia Gonçalves (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936

**Infestação, perfil de suscetibilidade e diversidade genética de *Triatoma infestans*
em quatro comunidades do município de Toro Toro (Potosi-Bolívia)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti (Orientadora/Presidente)

Prof. Dr. Edelberto Santos Dias (IRR) Titular

Prof. Dr. Roberta Lima Caldeira (IRR) Titular

Prof. Dr. Marcos Obara (UnB) Titular

Prof. Dr. Marcos HoracioPereira (ICB-UFMG) Titular

Prof. Dr. José Dilermando Andrade Filho (IRR) Suplente

Dissertação/Tese defendida e aprovada em: 24/02/2017

**A mis padres por ser el ejemplo de vida,
A mis hermanas por el cariño y apoyo,
A mi abuelo Pio, por el amor, ejemplo de vida y fortaleza,
A mi amada esposa por el apoyo, paciencia y amor,
A mis hij@s por ser parte y motor de nuestras vidas.**

AGRADECIMENTOS

A Dra. Liléia Diotaiuti pela oportunidade e acolhida, para poder desenvolver nossa pesquisa junto à equipe do Laboratório de Referência em Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas – LATEC, pela orientação, confiança, incentivo, ensinamentos e principalmente pelo amor de mai coruja para nós.

Ao Dr. David Gorla pela colaboração, pela amizade e por compartilhar suas experiências e pelo apoio incondicional.

A Dra. Grasielle Caldas DÁvila Pessoa pelo apoio incondicional e colaboração nos experimentos de bancada.

A Dra. Lineth Garcia Orellana, pelo apoio incondicional e por ser impulsora em continuar com minha formação acadêmica.

Ao Dr. Mirko Rojas Cortez pela colaboração e apoio para desenvolver esta pesquisa e ao Dr. Antonio Nogales Rodriguez (Servicio Departamental de Salud - Potosi, Programa Nacional de Chagas, Bolívia) ao Dr. Gonzalo Duran Pacheco e Lic. Omar Tenorio Vasquez pela disponibilidade e apoi para desenvolver esta pesquisa.

O Eduardo Melos Silva pela colaboração nos experimentos de bancada e a Ademilson de Azevedo pelos momentos gratos compartilhados no insterario.

A todos os meus amigos do LATEC (IRR-FIOCRUZ Minas) (Triatomíneos e Comportamento) pelo acolhimento diário, pelos momentos de convivência e acima de tudo pelo amadurecimento em coletividade.

Ao Instituto René Rachou - IRR pelo apoio institucional e pela oportunidade de desenvolver este trabalho em um dos mais reconhecidos centros de pesquisas da América Latina.

Ao Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e ao governo Brasileiro pela concessão da minha bolsa de estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Saúde do Brasil e a Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou (IRR) pela oportunidade e apoio no curso de doutoramento, em especial a Patrícia da Conceição e Andrea pelo carinho e apoio constantes.

À Escuela Técnica de Salud (Boliviano-Japonesa), pela doação de amostras para desenvolvimento de minha pesquisa, em particular ao Sr. Roberto Rodriguez por compartilhar seu conhecimento e suas experiências na área da entomologia médica.

A minha esposa Marinely pelo amor a paciência, compreensão e apoio incondicional e finalmente a meus filhos Pedrito e Luana por formar parte de minha vida no momento certo.

A minha família de latino-americanos, Luis Eduardo Martinez, Yesid Cuestas, Eugenia Castañeda, Flor Sosa, Jose Manuel Latorre e Khaterine Mosquera Duran, pela troca de experiências, companheirismos, palavras de incentivos e principalmente a boa convivência.

Agradeço de forma muito especial a minha família brasileira, Aline Cristine Luiz Rosa, Luciana Lima Ferreira, Newmar Pinto Marliere, pelo carinho e companheirismo, pelas palavras de incentivo, força, pela troca de experiência e amizade sincera construída nestes quatro anos juntos.

Lista de figura

- Figura 1.** Área de estudo do município de Toro, Potosí-Bolívia, com as 73 comunidades de estudo. Em amarelo as comunidades selecionadas: Taqó Taqó (1), Julo Chico (2), Julo Grande (3) e Calahuta (4), para a determinação da dinâmica de infestação e reinfestação (2014).....31
- Figura 2.** Distribuição das UDs avaliadas (antes e após borrifação), nas comunidades Os círculos indicam a localização das casas nas comunidades, de Taqó Taqó (Azul claro), Julo Chico (Verde), Julo Grande (Azul escuro) e Calahuta (Amarelo).....33
- Figura 3.** Coleta de *Triatoma infestans* em ambiente silvestre das comunidades de Julo Chico (A) e Julo Grande (B).....34
- Figura 4.** Número de *Triatoma infestans* capturados nos diferentes ambientes das comunidades de Toro Toro, antes e após borrifação.....65
- Figura 5.** Dendrograma gerado a partir da matriz de distância genética (F_{ST}) das populações de *T. infestans* de quatro comunidades de Toro, Potosi, Bolívia, através dos métodos: single, average, complete e ward.....76
- Figura 6.** Dendrograma gerado a partir da matriz de distância genética (F_{ST}) das populações de *T. infestans* dos diferentes ambientes domésticos (intra-peridomicílio) e silvestres.....79

Lista de tabelas

- Tabela 1.** *Loci* de microssatélites descritos para *T. infestans* com respectiva sequência dos iniciadores, arranjos de repetição, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento esperado.....36
- Tabela 2.** Detalhamento das PCRs de amostras de *T. infestans* realizadas neste estudo utilizando os marcadores descritos por Garcia *et al.* (2004) e Marcet *et al.* (2006).....42
- Tabela 3.** Número de Triatomíneos capturados nas comunidades de Taqó Taqó, Julio Chico, Julio Grande e Calahuta na fase de antes e após borrifação.....64
- Tabela 4.** Índice de infestação (II) e colonização (IC) para *T. infestans* nas UDs (Intra, peridomicílio) das comunidades do município de Toro Toro, antes e após borrifação.....67
- Tabela 5.** Modelo de multipla inferência, determinando as variáveis que apresentam maior efeito na infestação nas UDs pertencentes as quatro comunidades do município de Toro Toro, Potosi Bolívia.....49
- Tabela 6.** Infestação intradomiciliar (A), peridomiciliar (B) por *T. infestans*, antes (ID1) e após (ID2) a intervenção de controle e Infestação das UDs (C) por *T. infestans* no município de Toro Toro, Potosi, Bolivia.....68
- Tabela 7.** Infestação intra e peridomicilar (Inf) e abundância de *T. infestans* em casas antes e após intervenção de controle, segundo tipo de intra e peri, e tipo de cobertura vegetal.....70
- Tabela 8.** Efeito do tipo de material utilizado na construção de estruturas intra e peridomiciliar, sobre a infestação e abundância de *T. infestans* antes e após borrifação.....52
- Tabela 9.** Análises da diversidade genética baseada em nove locis microsateletes em seis populações de *Triatoma infestans* pertencentes as comunidades de TQ, JC, JG e CA (primeira fase).....62
- Tabela 10.** Análises da diversidade genética baseada em nove locis microsateletes em seis populações de *Triatoma infestans* pertencentes as comunidades de TQ, JC, JG e CA (segunda fase).....62

Tabela 11. Diversidade genética intrapopulação de *Triatoma infestans* na primeira e segunda fase.....63

Tabela 12. Matriz pareada con los valores de FST das populações de *Triatoma infestans* (primeira e segunda fase).....64

Tabela 13. AMOVA para os 9 locis analisados para as quatro comunidades (TQ, JC, JG, CA) de *Triatoma infestans*, no município de Toro Toro, Potosi, Bolivia.....65

Tabela 14. Analises da diversidade genética intraopulação dos ambientes domésticos (intra e peridomicilio) e silvestre dentro as cuatro comunidades.....

Tabela 15. AMOVA para os 9 loci analisados das populações totais dos diferentes ambientes onde *Triatoma infestans* esteve presente, no município de Toro Toro, Potosi, Bolivia.....67

Resumo

Na Bolívia a doença de Chagas (DC) é considerada um sério problema de saúde pública, com peculiaridades epidemiológicas que distinguem este país dos demais onde *Triatoma infestans* é a principal espécie responsável pela transmissão vetorial. O Departamento de Potosí é um dos mais pobres da Bolívia, embora esteja certificado livre de transmissão, ainda apresenta baixos índices de infestação das casas por *T. infestans* (1,2%). O presente estudo teve por objetivo determinar a infestação, suscetibilidade e a dinâmica espaço-temporal da infestação por *T. infestans* nas comunidades de Taqó Taqó (TQ), Julo Chico (JC), Julo Grande (JG) e Calahuta (CA) do município de Toro Toro (Potosí-Bolívia), antes e após borrifação.

Foi determinada a distribuição temporal e espacial da infestação das casas por *T. infestans* no município Toro-Toro (Potosí-Bolívia) e sua associação com variáveis ambientais no período 2009-2014. Foram avaliadas 73 comunidades e 16,489 casas. A presença de *T. infestans* foi registrada em 480 casas, com uma infestação global média das casas de 2,9%, variando entre 1,5-5,4% em 2009 e 2012. A infestação foi altamente agregada em cinco clusters, incluindo 11 comunidades, com risco relativo de infestação de 1,7-3,9 vezes o valor da média regional. As variáveis de temperatura e a precipitação foram identificadas como bons descritores de infestação domiciliar, explicando 57% da variabilidade observada. O modelo permitiu estimar áreas com maior probabilidade de infestação de casas para o município de Toro Toro.

Os processos de infestação e reinfestação foram avaliados nas comunidades de TQ, JC, JG e CA, (pré-borrifação / Janeiro 2014 e pós-borrifação / Novembro de 2014), incluindo um total de 95 unidades domiciliares (UDs). Na pré-borrifação 19 UD foram positivas e 11 após borrifação, com captura 285 e 219 triatomíneos no intra e peridomicílio, respectivamente. No ambiente silvestre 23 *T. infestans* foram capturados nas Comunidades de JC e JG e 5 indivíduos em JG (segunda etapa). Três variáveis estruturas presentes no peridomicílio (PD. Complex), presença de galinheiros (pcgall), diversidade de animais domésticos (Anim.complex) apresentaram um maior efeito na infestação das casas. No intradomicílio há evidente associação do triatomíneo com construções de pedras (50%), no peridomicílio foram 50% em pedras e 50% em adobe.

O perfil de suscetibilidade a deltametrina foi avaliado em todas as amostras coletadas nas quatro comunidades (pre e pós borrifação). Na pré borrifação 16 amostras de *T. infestans* foram avaliadas (duas amostras do intra, 12 do peridomicílio e dois silvestres). Todas as amostras mostraram-se resistentes (RR_{50} entre 25.66 e 54.70). Após a borrifação 13 amostras de *T. infestans* foram avaliadas (duas amostras do intra, 10 do peridomicílio e uma silvestre), com RR_{50} entre 21.91 e 40.67.

A estrutura populacional das comunidades através da análise com 9 locus de microssatélites ao nível macro e microgeografia apresentou uma alta estruturação populacional. Este fenômeno de redução do número de alelos observados, após a borrifação poderia estar afetando o sucesso do programa de Chagas nas comunidades.

Palavras chaves: *Triatoma infestans*, doença de Chagas, infestação, resistência a inseticidas, deltametrina, Macro e microgeografia.

Abstract

In Bolivia, Chagas disease (CD) is considered a serious public health problem, with epidemiological peculiarities that distinguish this country from others where *Triatoma infestans* is the main species responsible for vectorial transmission. The Department of Potosi is one of the poorest in Bolivia, and although it is certified free of transmission, it still presents low rates of house infestation by *T. infestans* (1.2%). The present study aimed to determine infestation, susceptibility and spatiotemporal dynamics of infestation by *T. infestans* in the communities of Taqó Taqó (TQ), Julo Chico (JC), Julo Grande (JG) and Calahuta (CA) of Toro Toro (Potosí-Bolivia), before and after insecticide spraying.

It was determined the temporal and spatial distribution of house infestation by *T. infestans* in the municipality of Toro-Toro, Potosi-Bolivia and its association with environmental variables in the period between 2009 and 2014. A total of 73 communities and 16,489 houses were evaluated. The presence of *T. infestans* was recorded in 480 houses, with a mean global house infestation of 2.9%, ranging from 1.5-5.4% in 2009 and 2012. The infestation was highly aggregated into five clusters, including 11 communities, with a relative risk of infestation of 1.7-3.9 times the value of the regional average. The variables of temperature and precipitation were identified as good descriptors of household infestation, explaining 57% of the variability of home infestation. The model enabled the prediction of areas with higher probability of house infestation in the municipality of Toro Toro.

The infestation and reinfestation processes were evaluated in the communities of TQ, JC, JG and CA, (pre-spraying / January 2014, and post-spraying / November 2014), including a total of 95 households (UDs). In the pre-spraying period, 19 UD's were positive, whereas 11 were after spraying. A total of 285 and 219 triatomines were captured in the intra and peridomicile respectively. In the wild, 23 *T. infestans* were captured in the JC and JG communities, and 5 individuals in JG (second phase). Three variables structures present in the peridomicile (PD Complex), presence of chicken coops (PCGall) and diversity of domestic animals (Anim.complex) had a greater effect on house infestation. In the intradomiciles, there is evident association of triatomine with stone constructions (50%), in the peridomicile were 50% in stones and 50% in adobe.

The susceptibility profile to deltamethrin was evaluated in all samples collected in the four communities (pre and post spraying). For the pre-spraying period, 16 samples of *T. infestans* were evaluated (two intra, 12 peridomicile, and two wild samples). All samples were resistant (RR50 between 25.66 and 54.70). After spraying, 13 samples of *T. infestans* were evaluated (two intra, 10 peridomicile, and one wild sample), with RR50 between 21.91 and 40.67.

The population structure of the studied communities, through analysis with 9 microsatellite loci, presented a high population structure at macro and microgeography levels. This phenomenon of reduction of the number of alleles observed after and before spraying could be affecting the success of the Chagas program in this communities.

Keywords: *Triatoma infestans*, Bolivia, Chagas disease, infestation, insecticide resistance, deltamethrin, Macro and Microgeography.

Lista de abreviaturas e símbolos

AMOVA - Análise de Variância Molecular

ANOVA – Análise de Variância

BHC - Hexaclorobenzeno

BID - Banco Interamericano de Desenvolvimento

CIPEIN- Centro de Investigaciones en Plagas y Insecticidas

CONICET - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou

DC - Doença de Chagas

DD - Doses diagnóstica

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DL₅₀ - Dose letal 50%

DL₉₅ - Dose letal 95%

DL₉₉ - Dose letal 99%

DNA - Ácido desoxirribonucleico

HCH - Hexaclorociclihexano

HI - Índice de casas

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IIBISMED - Instituto de Investigaciones Biomédicas e Interacción Social

INCONSUL - Iniciativa Intergovernamental do Cone Sul

INE - Instituto Nacional de Estadística

KD - knockdown

Kdr - Resistência Knockdown do inglês “Knockdown resistance”

LATEC - Laboratório de referência Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

LRS - Linhagem referência de suscetibilidade

m.s.n.m. - metros sobre o nível do mar.

mg/min – miligramas por minuto

MSDB - Ministério da Saúde da Bolívia

ng i.a./ninfas - Nanogramas de ingrediente ativo por ninfa tratada

nm - Nanômetros

°C – graus Celsius

SDMs - Modelos de distribuição de espécies
ONGs - Organizações Não-Governamentais
OPAS - Organização Panamericana de Saúde
POMA Programa Mundial de Alimentos
PNCH - Programa Nacional de Chagas
QGIS- Sistemas de informação geográfica
RR - Razão de resistência
UDs- Unidades Domiciliares
UNICEF- Fundo das Nações Unidas para a Infância
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1. Generalidades da Doença de Chagas	18
1.2. Doença de Chagas na Bolívia	18
1.3. Importância epidemiológica de <i>Triatoma infestans</i> na Bolívia	20
1.4. Controle vetorial da Doença de Chagas	21
1.5. Controle vetorial na Bolívia	22
1.6. Resistência aos inseticidas	24
1.7. Resistência de <i>T. infestans</i> a inseticidas	25
1.8. Estruturação populacional de <i>T. infestans</i>	27
1.8.1. Genética de populações “microssatélites”	27
1.9. Predição espacial e modelos de distribuição	28
2. Justificativa	31
3. Objetivos	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. Metodologia	34
4.1. Área de estudo	34
4.2. Comunidades do estudo	35
4.3. Padrão de infestação triatomínica no ano 2014	35
4.3.1. Coleta dos triatomíneos nas unidades domiciliares (UDs), antes e após a aplicação de inseticida	35
4.3.2. Coleta dos triatomíneos no ambiente silvestre	36
4.3.3. Identificação dos Triatomíneos	37
4.4. Manutenção de colônias	37
4.5. Dinâmica da infestação e reinfestação por <i>T. infestans</i>	38
4.5.1. Marcadores microssatélites	38
5. Resultados	42
5.1. Artigo 1 Spatial and temporal distribution of house infestation by <i>Triatoma infestans</i> in the Toro Toro, Potosi, Bolivia	42
5.2. Artigo 2 Resistance to deltamethrin by domestic and wild <i>T. infestans</i> populations in the municipality of Toro Toro, Potosi, Bolivia	50

5.3. Dinamica da infestação e variabilidade genética das populações de <i>T. infestans</i> nas quatro comunidades do município de Toro Toro	57
5.3.1. Inquérito entomológico antes e após borrifação	57
5.3.2. Índice de infestação (II), colonização (IC), para <i>T. infestans</i> antes e após borrifação	59
5.4. Diversidade genética dentro as populações de <i>Triatoma infestans</i> procedentes das quatro comunidades de Toro Toro	65
5.4.1. Ao nível macrogeográfico entre comunidades	65
5.4.2. Análise de variância molecular (AMOVA)	68
5.5. O nível microgeográfico dentro as comunidades (ambiente doméstico e silvestre)	69
5.5.1. Análise de variância molecular (AMOVA)	71
6. Discussão	73
7. Conclusão	78
8. Referências	79
9. Anexos	92
9.1 Anexo1. Pontos Georeferenciados das 73 comunidades existentes no município de Toro Toro.....	92
9.2 Anexo2. Número de UDs, nas comunidades de Taqó Taqó (TQ), Julo Chico (JC), Julo Grande (JG) e Calahuta (CA), e local de captura antes e após a intervenção química	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades da doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana foi descoberta em Lassance, Minas Gerais, por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909). Considerada uma zoonose parasitária de natureza endêmica no continente Americano, a DC tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2002; Coura, 2003) que infecta pessoas no continente Americano pelo menos há 9.000 anos atrás (Rothhammer *et al.* 1985; Aufderheide *et al.* 2004; Werner Apt *et al.* 2008).

Trypanosoma cruzi é transmitido ao homem através das fezes de insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), responsável por mais de 80% dos casos humanos (Schofield, 1994; WHO, 2002). A DC é considerada um importante problemática da saúde pública para vários países no mundo, na América representa a principal causa de lesões cardíacas e intestinais em jovens e adultos economicamente produtivos (Dias, 2008). Na década de 1980 estimava-se mais de 100 milhões de pessoas em risco de infecção e 24 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (Schofield, 2006). De acordo com estimativas baseadas em dados até 2010, 5.742.167 pessoas foram infectadas com *T. cruzi* nos 21 países da América Latina, dentre os quais 3.582.423 pessoas eram procedentes de países do Cone Sul (WHO, 2015).

O crescente número de indivíduos infectados (Dias *et al.* 2002) e a ampla distribuição de *Triatoma infestans* (Gorla, 2002) levou à implementação da “Iniciativa Intergovernamental do Cone Sul” (INCOSUL), conformada por seis países (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) com o principal objetivo da eliminação da transmissão vetorial pelo *T. infestans*, principal vetor da DC nestes países, e da via transfusional, por meio de triagem de bancos de sangue (Dias & Schofield, 1998; Silveira, 2002).

1.2. Doença de Chagas na Bolívia

Com altos índices de pobreza e a debilidades das políticas de saúde apresentados neste país, a DC sempre foi negligenciada, afetando principalmente populações de escassos recursos econômicos nas áreas rurais. Dois terços do país abrangem 60% das zonas endêmicas (Dias & Schofield, 2007) que compreendem seis dos nove Departamentos: Cochabamba, Chuquisaca, Santa Cruz e Tarija e estende-se a algumas áreas dentro dos Departamentos de

La Paz e Potosí, os quais incluem regiões tropicais, subtropicais e vales. As variações de prevalência da DC, assim como os diferentes perfis clínico-epidemiológicos estão ligadas à distribuição geográfica do principal vetor *T. infestans*, que compreende áreas entre os 300 a 3.500 m.s.n.m. (Jáuregui & Valdivia, 1972; Cortez *et al.* 2007; PNCCH, 2008). Atualmente dos 9.947.000 habitantes no território boliviano estima-se que 607.186 estão infectadas com *T. cruzi* e 8.087 novos casos de pessoas infectadas devido a transmissão vetorial (WHO, 2015).

Em 1941 é descrito pela primeira vez um caso de miocardite chagásica no Departamento de Potosí (Romero & Borda, 1978); no mesmo Departamento Maza & Chacon, em 1943, encontraram uma criança de dois meses de idade com sinal de Romaña (Jáuregui & Valdivia, 1972; Romero & Borda, 1978).

Posteriormente a partir de 1946 foram descritos diferentes relatos de novos casos nos departamentos de Cochabamba, Potosí e La Paz (Romaña, 1963; Jáuregui & Valdivia, 1972; Romero & Borda, 1978). De acordo com relatos de Jáuregui & Valdivia (1972), dez anos após foram publicados os primeiros casos de Chagas aguda descritos por Rodriguez Rivas nos Departamentos de Cochabamba e Santa Cruz. No Departamento de Santa Cruz a investigação das condições de saúde de um grupo de soldados demonstrou a ocorrência da DC crônica. Cinco anos após novo estudo epidemiológico realizado neste mesmo Departamento, incluindo três grupos socioeconômicos (nível baixo, médio e alto), evidenciou que estes pacientes apresentavam miocardite chagásica, similar fenômeno observado por Perez no mesmo ano no Departamento de Tarija (Ribera, 1985).

Seguidamente, no período de 1980 a 1985, se realizou uma investigação com a finalidade de determinar a magnitude e distribuição da DC ao nível nacional (Chungara, 1999). Entretanto, só na década de 90, inquéritos realizados nas diferentes áreas endêmicas da Bolívia, mostram taxas de infecção de 26% até 71% em crianças (1 a 6 anos), e em adultos de 32% até 93,5% (Noireau, 1999; Chippaux *et al.* 2008), sendo as comunidades com maior soroprevalência dos Departamentos de Cochabamba, Chuquisaca, Tarija, Santa Cruz e Potosí (Guillen *et al.* 1997).

Diferentes estudos determinaram que mais de 50% do território nacional era endêmico e cerca de 40% da população que morava nesta área encontrava-se infectada e que principal via de transmissão era vetorial (PNCCH, 2008). Só no último estudo de WHO (2015), os

resultados mostraram-se alentadores devido a uma redução significativa de casos humanos da DC na Bolívia e onde vários fatores contribuíram para essa redução, entre eles o êxito do controle vetorial, assim como a melhoria dos fatores socioeconômicos (Lardeux *et al.* 2010).

Estas evidências da DC observadas nos diferentes Departamentos na Bolívia, são atribuídas em grande parte à transmissão por *T. infestans* (transmissão vetorial). Porém esta via não era a única que estava presente na Bolívia. Devido a que outras formas de transmissão foram descritas antes do início do programa de Chagas em Bolívia. Estas outras vias são: transmissão transfusional e que segundo a Zuna *et al.* (1985) e WHO (1991) esta apresentava altos valores de prevalência (>60%), já a transmissão congênita apresentava valores > 49% (Azogue *et al.* 1985; Recacoechea *et al.* 1989; Azogue & Darras, 1995). Entretanto, na atualidade tanto os valores da prevalência da transmissão transfusional e transmissão congênita foram reduzidas a 19,4%, a entre 2% respectivamente (PNCCH, 2008).

1.3. Importância epidemiológica de *Triatoma infestans* na Bolívia

Triatoma infestans principal vetor da DC nos países do Cone Sul da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai e Bolívia) (Schofield, 1994), continua tendo grande importância nas áreas onde a espécie ainda persiste, como na região do Gran Chaco da Argentina, Bolívia e Paraguai e em algumas áreas dos vales Interandinos da Bolívia (Bustamante *et al.* 2014, 2016).

Dentre as características que distinguem *T. infestans* de outros triatomíneos são a boa capacidade de domiciliação e antropofilia (Forattini, 1980). É comum observar colônias em torno dos animais de criação para consumo local ou familiar (galinheiros, cabras e porcos) que muitas vezes são o principal sustento econômico, assim como nas estruturas geralmente precárias de adobe, abrigando-se em buracos e fendas das moradias humanas (Cécere *et al.* 1998; Lorenzo & Lazzari, 1999).

Contudo, só nos anos 90, após a implementação do programa de controle, foi estimado que a infestação das casas por *T. infestans* na Bolívia oscilava entre 40 e 80%, onde as áreas rurais apresentaram os maiores índices de infestação (70- 100%) e na área Peri-urbana entre os 40–60% (Arata *et al.* 1994; MPSSP/PNCCH, 2003).

Departamentos como La Paz, Cochabamba e Potosí apresentavam infestações superiores a 52% antes do início das atividades do controle vetorial, posteriormente através das ações realizadas pelos diferentes programas Departamentais em 2010 tiveram um grande impacto, reduzindo a infestação vetorial até 1,3% no Departamento de La Paz, 3,2% no Departamento de Cochabamba e para o Departamento de Potosí para 1,2% (OPS, 2011). Estes resultados obtidos nos últimos 10 anos são produto de diferentes ações como a participação comunitária no controle vetorial e borrifações, entretanto tais valores obtidos apesar de serem baixos, ainda apresentam um risco na transmissão vetorial nestes Departamentos, pela presença de triatomíneos residuais os quais podem manter o ciclo de *T. cruzi*.

O reconhecimento da existência de focos silvestres de *T. infestans* vem se tornando mais frequentes, sobretudo nos Vales Andinos na Bolívia, assim como na região do Chaco da Bolívia, Paraguai e Argentina (Bermúdez *et al.* 1993; Noireau *et al.* 1999; Noireau *et al.* 2005; Cortéz *et al.* 2007; Yeo *et al.* 2005; Ceballos *et al.* 2009). Desta forma, as populações de *T. infestans* silvestres não se restringem aos Vales andinos da Bolívia, mas devem ter sua importância avaliada, pois além de serem responsáveis pela manutenção do ciclo natural da transmissão de *T. cruzi*, podem ser uma fonte importante da reinfestação de ambientes domésticos tratados com inseticida (Noireau *et al.* 2009; Ceballos *et al.* 2011).

1.4. Controle vetorial da Doença de Chagas

Na ausência de uma vacina disponível e eficaz contra a infecção pelo *T. cruzi*, o controle vetorial constitui uma das ferramentas de maior eficácia, através da borrifação das casas com inseticidas de ação residual, além do melhoramento das casas (Dias, 2007).

O controle vetorial de DC começou em meados do século XX, estimulada pela experiência bem-sucedida em controlar vetores da malária usando inseticidas sintéticos (Mougabure-Cueto, & Picollo, 2015).

Entretanto, critérios para a seleção e aplicação dos inseticidas devem ser tomados em conta, como por exemplo, as peculiaridades ecológicas das distintas espécies de triatomíneos em cada região endêmica. A metodologia clássica seguida pelos programas de controle preconiza várias fases operacionais para a aplicação de inseticidas: 1) fase de preparação, para o mapeamento da área a ser tratada, programação de atividades e estimativa de

recursos; 2) fase de ataque que consiste em uma borrifação massiva de todas as moradias, seguida por uma segunda borrifação das moradias com reinfestação após seis meses e 3) uma fase de vigilância para a detecção de focos residuais de triatomíneos após as intervenções com inseticida (Zerba, 1999; Moncayo & Silveira, 2009). A técnica de borrifação é muito rigorosa em relação às doses aplicadas, assim como a proteção dos moradores e dos aplicadores (OMS, 1960; Azeredo, 2015).

Resultados destas constantes ações realizadas pelos diferentes programas dos países que compõem a iniciativa do INCOSUL em um período de 1991-2005 alcançaram logros importantes como a redução e eliminação de *T. infestans* em grande parte da área de distribuição (Gorla, 2002; Schofield *et al.* 2006). Em 1997 a OPAS certificou o Uruguai livre da transmissão vetorial pelo *T. infestans* e transfusão de sangue. Seguidamente, em 1999, Chile obteve o mesmo resultado e Brasil foi certificado em 2005 (WHO, 1994; OMS, 2002; OPS, 2005; Dias *et al.* 2002; Schofield *et al.* 2006; Rassi *et al.* 2010; WHO, 2015).

A Argentina teve certificações parciais a partir de 2001 em quatro províncias endêmicas da DC. Já o Paraguai no ano 2002, consegue a interrupção da transmissão vetorial pelo *T. infestans* em um Departamento e mantém a vigilância em boa parte da sua área endêmica. Estas iniciativas, vinte anos após a criação do INCOSUL, mostraram resultados espetaculares, sobre tudo na redução de 99% da prevalência da DC em America Latina (Dias *et al.* 2002, Schofield *et al.* 2006).

1.5. Controle vetorial na Bolívia

Na Bolívia acredita-se que uma limitação do controle vetorial possa ser o tipo de construção das casas e seus anexos, assim como os hábitos da população, a acessibilidade às casas, nível econômico e sócio cultural da população (Tonn, 1978).

Em 1962 através de uma proposta por Torrez & Avila viu-se a necessidade de planejar a criação de um programa de controle da doença de Chagas na Bolívia (Chungara, 1992), no entanto esta iniciativa teve pouco êxito e unicamente a partir de 1980 foi delineado o Programa Nacional de Chagas, conduzido pelo Dr. Angel Valencia.

As primeiras tentativas de intervenções foram dirigidas para os aspectos de educação em áreas endêmicas, através de limpeza das casas por participação comunitária, com o financiamento do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). De 1986 a 1999 o

Programa Mundial de Alimentos (POMA) contribuiu com programa Nacional de Chagas através de projetos titulados “Atenção Primária em saúde nas zonas rurais infectadas pela DC” por meio de iniciativas que consistiam na obtenção de uma cesta básica de alimentos, como remuneração por trabalho realizado na melhoria das moradias com tecnologia própria e uso de materiais locais (Guillen *et al.* 1997).

O início das intervenções na Bolívia e aplicação de inseticidas foram através do uso de equipamentos convencionais de compressão manual, utilizados no controle da Malária. Estas atividades e seus ótimos resultados despertaram o interesse de várias instituições e ONGs, gerando projetos de intervenção nas diferentes regiões. Em resposta aos altos índices de infestação foram desenvolvidos diferentes projetos nas regiões, os quais são descritos a seguir:

O projeto de DESARROLLO AGROPECUARIO COTAGAITA SAN JUAN DE ORO (1982-1992) constitui a primeira experiência integral entre o controle vetorial, educação, atenção ao paciente e melhoria de casas (OMS, 2002). No entanto, a partir de 1986 o projeto incluiu o controle de vetores mediante o uso de inseticidas. Assim 23.649 UDs foram borrifadas e melhoradas evitando a reinfestação por *T. infestans* (Guillen *et al.* 1999), demonstrando que com o controle vetorial e participação comunitária é capaz de interromper a transmissão vetorial.

Simultaneamente ao desenvolvimento do programa piloto (COTAGAITA SAN JUAN DE ORO) o Servicio Nacional de Salud e o Programa de Control de Chagas (SNS/CCH), em 1990, replicaram esta experiencia nos Departamentos de Cochabamba, Chuquisaca e Tarija, gerando as bases para a intervenção e estruturação de um Programa Nacional. A seleção destas áreas de trabalho e sua execução foram baseadas na alta infestação das casas em áreas endêmicas, apresentando valores que oscilavam entre os 20 e 70% de infestação e taxas de infecção humanas por *T. cruzi* de 40 e 80%, e de infecção de mamíferos domésticos de 7-60% (Ribera, 1985). Outro critério foi à acessibilidade e disponibilidade das comunidades para participar no melhoramento das UDs (Arata *et al.* 1994).

No entanto, apesar dessas ações terem sido desenvolvidas no início de 1990, só no ano 2000, através do crédito outorgado pelo Banco Internacional de Desenvolvimento (BID), a Bolívia teve o início do programa de controle vetorial ao nível nacional, desenvolvido durante um período consecutivo de 10 anos, com campanhas sistemáticas e intensivas de

borrifação com inseticidas, o que permitiu uma redução da transmissão vetorial (Guillen *et al.* 1999).

26 anos após do estabelecimento do INCOSUL, apesar dos esforços realizados por parte do programa nacional, a transmissão da DC pela via vetorial continua em áreas endêmicas da Bolívia como na região do Grande Chaco e Vales Interandinos, onde *T. infestans* apresenta colônias nos ambientes intra e peridomicílio (Noireau *et al.* 2005). Apesar de que a DC é considerada uma prioridade nacional, por representar uma problemática séria de saúde pública e social por sua magnitude, transcendência e impacto (PNCCH, 2008), esta enfermidade é negligenciada em grande parte do território nacional, uma vez que os esforços não têm atualmente a mesma evidência como foi no início do programa.

1.6. Resistência aos inseticidas

A primeira defesa dos artrópodes contra agentes patogênicos e tóxicos é realizada pela cutícula, que representa a primeira barreira de proteção. A inibição da síntese de lipídios na superfície da cutícula altera a barreira de proteção dos insetos permitindo a penetração de inseticidas, afetando também o ciclo de vida (Juarez, 1995).

No caso dos triatomíneos, a cutícula representa uma barreira importante para o ingresso do inseticida, reduzindo a penetração ou gerando uma lentidão para chegar ao sítio alvo, implicando uma diminuição do potencial de toxicidade do composto (Germano, 2012).

A resistência aos inseticidas é resultado do uso intensivo de inseticidas sobre uma população, que resulta em uma pressão de seleção. Assim, a repetida aplicação de inseticida numa população gera um aumento na proporção de insetos com capacidade de tolerar doses que poderiam ser letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal (Oliveira Filho, 1984; Roush & McKenzie, 1987; Roush & Daly 1990).

A velocidade para o aparecimento da resistência depende da intensidade da pressão de seleção sobre os indivíduos da população, ciclo de vida e taxa de reprodução da espécie, além da frequência e expressão dos genes que conferem a resistência, e a natureza destes genes (recessivos ou dominantes) (Perry *et al.* 1998).

As resistências aos inseticidas podem ter origem comportamental, fisiológica e/ou bioquímica além da modificação do sítio alvo (Brogdon & McAllister, 1998).

1.7. Resistência de *Triatoma infestans* a inseticidas

Resistência aos inseticidas em triatomíneos era considerada pontual e com pouca probabilidade de ocorrer já que o ciclo de vida destes insetos é bastante longo (OMS, 1960, Gorla & Schofield 1989; Schofield, 1989, Gorla, 1994). No entanto os últimos anos mais estudos demonstraram a resistência de populações de *T. infestans* aos inseticidas piretróides.

A primeira evidência bem documentada do fenômeno da resistência foi observada em populações venezuelanas de *Rhodnius prolixus* ao dieldrin, e resistência cruzada ao BHC e baixa suscetibilidade a fenitión e propoxur (Gonzales-Valdivieso *et al.* 1971; Nelson & Colmenares, 1979). Na mesma espécie na Colômbia demonstrou-se indícios de resistência ao dieldrin e malatión (Fox *et al.* 1966).

Os primeiros relatos de resistência aos inseticidas para populações de *T. infestans*, foram no sul do Peru, demonstrando uma alta tolerância ao dieldrin (Fox *et al.* 1966). No Brasil foi relatada resistência a deltametrina, β -ciflutrina e a cipermetrina (Vassena *et al.* 2000). No entanto, passou muito tempo até que se realizassem estudos sistemáticos deste fenômeno, sendo a OMS quem reuniu especialistas no Centro de Investigaciones en Plagas y Insecticidas, CIPEIN (CONICET/ CITEFA, Buenos Aires, Argentina), para desenvolver um protocolo para avaliar a suscetibilidade de populações de *T. infestans* e *R. prolixus* a diferentes inseticidas (Vassena *et al.* 2000).

O uso do protocolo pela primeira vez pelo CIPEIN, na década de 1990 (Vassena *et al.* 2000), resultou na identificação de populações resistentes de *R. prolixus* oriundos da Venezuela com razão de resistência (RR_{50}) igual a 12,4 para cipermetrina e de 11,4 para deltametrina. Para populações de *T. infestans* procedentes do Rio Grande do Sul-Brasil, observou-se RR_{50} igual a 7 para deltametrina. Estudos recentes indicam que a persistência de focos residuais de *T. infestans* no Rio Grande do Sul não está relacionada à resistência aos inseticidas, mas pode estar associada a falhas operacionais (Pessoa *et al.* 2015). Posteriores estudos por Vassena & Picollo (2003) registraram níveis de resistência incipientes a deltametrina para *T. infestans*, de comunidades de quatro províncias da Argentina (populações de Catamarca, San Luis, Mendoza e Salta).

A partir destes dados na Argentina foram investigadas outras comunidades da Província de Salta como El Chorro, La Toma, El Sauzal e Salvador Mazza, onde o Serviço Nacional de Chagas vinha advertindo falhas no controle de *T. infestans* (infestação das unidades domiciliares > 80%) (Zerba & Picollo, 2002). Resultados obtidos por Picollo *et al.* (2005) nestas comunidades corroboraram a existência de resistência a deltametrina de populações de *T. infestans*, chegando-se a observar valores de RR₅₀ de 99 na província El Chorro e de 133,1 na província Salvador Mazza. Paralelamente foram avaliados outros inseticidas piretróides como betaciflutrina, betacipermetrina, lambdacialotrina e cipermetrina, mostrando resistência das populações de *T. infestans*, entretanto estas mesmas populações de triatomíneos mostraram ser suscetíveis a outras classes de inseticidas, como o fenitrotion (organofosforado), o bendiocarb (carbamato) e o fipronil (fenilpirazol) (Picollo *et al.* 2005).

Estudos na área limítrofe entre Argentina e Bolívia (províncias de Salta e de Yacuiba, respetivamente) apresentaram valores altos de resistência a deltametrina (Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Toloza *et al.* 2008, Germano *et al.* 2010). Porém estudo na região do Grande Chaco Boliviano, Argentino e Paraguai avaliando a suscetibilidade de populações domésticas de *T. infestans* a deltametrina, mostraram que as populações bolivianas resultaram com maiores valores de RR₅₀, comparados com as outras populações (Germano *et al.* 2010). Porém estes resultados sobre a resistência aos piretróides por parte de populações domésticas demonstram a existência de áreas críticas, que abrangem não somente a Argentina, Paraguai, mas também a Bolívia.

Recentemente, altos níveis de resistência à deltametrina (RR₅₀ de 17,4 a 542), foram descritos no centro e sul da Bolívia, que compreende os Departamentos de Chuquisaca, Cochabamba, Santa Cruz e Tarija na região do Chaco (Santos Orihuela *et al.* 2008; Germano *et al.* 2010; 2012; Lardeux *et al.* 2010; Gomez *et al.* 2014).

Estudos realizados em populações domésticas de *T. infestans* por Lardeux *et al.*, (2010) e Depeckire *et al.*, (2012) relataram diferentes níveis de resistência a deltametrina em várias localidades de cinco Departamentos da Bolívia (La Paz, Cochabamba, Chuquisaca Tarija e Santa Cruz), sendo atribuídos aos Departamentos de Tarija, Chuquisaca e Santa Cruz os

maiores valores de resistência ($RR_{50} > 818$); no restante dos Departamentos a RR_{50} variou de 3,7 a 14, evidenciando diferentes níveis de resistência ao nível regional e nacional.

Estas populações domésticas de *T. infestans* das regiões Andinas da Bolívia são de particular interesse porque mostram diferentes padrões de resistência à deltametrina o que poderia contribuir para delinear estratégias adequadas pelo programa de controle.

Por outro lado, é importante destacar que estudos recentes em populações silvestres provenientes dos Vales Andinos de Cochabamba e da região do Chaco na Bolívia mostraram suscetibilidade a deltametrina (Depickère *et al.* 2012; Gomez *et al.* 2014). Contrariamente ao observado pelos autores mencionados acima, Acevedo *et al.* 2011 e Depickère *et al.* 2012 reportam resistência aos piretróides e ao fipronil em populações silvestres de *T. infestans* coletadas em Vales Andinos de Cochabamba e do Norte Potosi.

Devido à extensão geográfica da Bolívia, estas informações são consideradas insuficientes para conhecer e determinar a área de distribuição da resistência de *T. infestans*, sendo necessário avaliar outras áreas de ocorrência desta espécie, ampliando não só para populações domésticas, mas também para populações silvestres.

1.8. Estrutura populacional de *Triatoma infestans*

1.8.1. Genética de populações “microssatélites”

Outra técnica para determinar a estrutura populacional de *T. infestans* é o uso dos microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR – *Simple sequence repeats*) que são marcadores genéticos altamente polimórficos, neutros, com codominância e altas taxas de mutação (Jarne & Lagoda, 1996; Roos *et al.* 1998), excelente ferramenta para diferenciar e determinar estruturas populacionais. Essas sequências são abundantes nos genomas de procariotos e eucariotos (Li *et al.* 2002), estando presentes em regiões codificantes e não codificantes do genoma (Morgante *et al.* 2002).

A análise do microssatélite na área da entomologia vêm sendo utilizada para estudos de genética populacional, mostrando-se ser relevante nos estudos de epidemiologia e controle de vetores transmissores de doenças, fornecendo informações importantes sobre o fluxo gênico, e a capacidade do vetor de invadir o peridomicílio.

Com a finalidade de identificar e caracterizar diferentes populações de *T. infestans* foram realizados diferentes estudos com marcadores microssatélites. Garcia *et al.* (2004) e Marcet *et al.* (2006) analisaram e caracterizaram mais de 20 loci, em populações de *T. infestans* dos Vales Andinos de Cochabamba (Bolívia), dentre os quais 8 loci mostram-se altamente polimórficos.

Diversos estudos na Bolívia, sobre a variabilidade genética de *T. infestans* através do uso de microssatélites revelaram que existe uma diferenciação entre populações domésticas e silvestres de três locais de captura circundantes à localidade Cotapachi, no vale de Cochabamba (Richer *et al.* 2007). Por outro lado, populações de *T. infestans* procedentes do Departamento de Chuquisaca mostram-se altamente estruturadas (Pizarro *et al.* 2008) e que populações de procedência do Grande Chaco apresentaram características fenotípicas da zona Andina (Quisberth *et al.* 2011), possivelmente resultado de uma mistura de populações "Andina" e "não Andina" (Panzer *et al.* 2014).

Diferentes estudos sobre a variabilidade genética de *T. infestans* onde foram empregados diversos marcadores moleculares e fenotípicos (Garcia *et al.* 2003; Monteiro *et al.* 1999; Pérez de Rosas *et al.* 2007; Pérez de Rosas *et al.* 2008; Schachter-Broide *et al.* 2004, Brenière *et al.* 2013), concluíram que *T. infestans* apresenta baixos a moderados índices de variabilidade genética intrapopulacional e de moderada a alta diferenciação genética interpopulacional. Possivelmente este perfil é resultado da grande dispersão desta espécie na América Latina, assim como das constantes intervenções dos programas de controle, através da aplicação de inseticidas, que promovem seleção das populações, com a consequente redução da variabilidade genética local.

1.9. Predição espacial e modelos de distribuição

O conhecimento da distribuição geográfica dos vetores de doenças é de grande importância, já que auxilia a avaliação epidemiológica da doença nos programas de controle. A ausência do conhecimento da distribuição de alguns vetores de importância médica, fez com que na atualidade ferramentas como modelos de predição, foram utilizados com maior frequência, no momento da avaliação de recursos e na planificação de estratégias (Franklin, 1995; Austin, 2002; Guisan & Zimmermann, 2000).

Estes modelos de predição de distribuição de espécies geralmente são empíricos, pois são baseados no georeferenciamento das amostras de campo (população estudada) e são aplicados especificamente para modelar a ocorrência de uma espécie numa determinada área, através de métodos estatísticos e/ou computacionais (Guisan & Thuiller, 2005; Guisan *et al.* 2006). Estão baseados em dois tipos de variáveis: as dependentes, que refletem a presença ou ausência de um organismo, geralmente provierem de coordenadas geográficas. As variáveis independentes geralmente são informações recopiladas de sensores remotos ou estações meteorológicas (geológicos, topográficos ou climáticos) onde estas informações são específicas para a área de estudo (Mateo *et al.* 2011). Para a modelagem da distribuição de espécies são utilizadas variáveis bioclimáticas como as de Bioclim, derivadas dos valores mensais de temperatura e precipitação, com a finalidade de gerar variáveis biologicamente significativas (<http://www.worldclim.org>).

Segundo Guisan e Zimmermann (2000), muitos fatores ambientais exercem um efeito sobre a distribuição das espécies de forma direta ou indireta. As variáveis ambientais mais utilizadas para gerar modelos de distribuição são: as climáticas, geológicas, topográficas, elevação, índices de vegetação, temperatura da superfície (Bradley & Fleishman 2008; Marini *et al.* 2010, Kreakie *et al.* 2012), além das variáveis do tipo demográfico, ocupação de espaço, índice populacional, densidade e grau de influência antrópica. Entretanto, apesar dos fatores ambientais serem importantes, sua influência em determinados lugares é particular e dependerá das diferentes características do local de estudo. Qualquer mudança nestes fatores ambientais parece influenciar na distribuição temporal, espacial, dinâmica e na abundância populacional dos vetores, assim como na epidemiologia da doença (Gorla, 2002), afetando na biologia e ecologia dos vetores, assim como a presença dos hospedeiros e reservatórios, através do incremento ou redução da população em função à disponibilidade do alimento.

Esta relação entre a distribuição geográfica de espécies e variáveis ambientais como a temperatura, umidade, precipitação e altura foi observada para algumas espécies de triatomíneos (Carcaballo, 1999; Ramsey *et al.* 2000; Gorla, 2002; Bustamante *et al.* 2016).

No caso de *T. infestans*, apesar de estar fortemente ligado ao ambiente doméstico, existe um perfil ambiental bom para esta espécie, que nem sempre é associado com a disponibilidade de alimento nas moradias. Isto quer dizer que as características

macroambientais percebidas por *T. infestans* podem ser suavizadas pelas condições microambientais do habitat doméstico, definindo as áreas que podem ser colonizadas por esta espécie (Gorla *et al.* 2010). Por outro lado, a colonização das casas por *T. infestans* é determinada pela amplitude térmica e a densidade da vegetação (Gorla, 2002) os quais representam preditores diretos e indiretos da presença de esta espécie. Já ao nível macroambiental se observa que a temperatura mínima média mensal é um bom indicador da distribuição potencial e da capacidade de crescimento de populacional de *T. infestans* (Gorla *et al.* 1997).

2. JUSTIFICATIVA

Na Bolívia a DC ainda é um problema de saúde pública, apresenta peculiaridades epidemiológicas que o distingue de todos os países onde *Triatoma infestans* ainda continua sendo o principal responsável pela transmissão vetorial. Antes do início do Programa Nacional de Chagas, Departamentos como Cochabamba, Tarija, Chuquisaca, La Paz e Potosí, apresentavam áreas rurais e periurbanas, com altos índices de infestação por *T. infestans* (Arata *et al.* 1994; MPSSP/PNCCH, 2003) estimava-se que aproximadamente 1.300.00 de pessoas estariam infectadas com *Trypanosoma cruzi* (OPAS, 2011). Porém, na atualidade, este número foi reduzido consideravelmente chegando-se a observar 60.186 pessoas com DC (WHO, 2015)

Dentro os Departamentos anteriormente mencionados, o Departamento de Potosí apresentava uma área endêmica com altos índices de infestação de *T. infestans* (75%), e um alto risco de transmissão de *T. cruzi*. Dez anos após da execução do programa de controle com intervenções químicas, a infestação por *T. infestans* no Departamento foi reduzida a 2,4%. Atualmente graças aos diferentes esforços realizados pelo Programa Departamental de Chagas Potosí, alcançaram o índice de infestação das casas por *T. infestans* de 1,2%, índice considerado de baixo risco para a transmissão vetorial, resultando posteriormente na sua certificação de livre de transmissão por *T. infestans* outorgado pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS, 2011). Apesar dos bons resultados obtidos pelo programa departamental, os altos índices de pobreza observados e as condições precárias das viviendas, fazem com que os baixos índices de infestação alcançados neste Departamento resultassem um risco contínuo para novas e constantes reinfestação das casas por *T. infestans*.

Os programas de controle da DC, além da otimização das estratégias de controle vetorial mediante a aplicação de inseticida e uma contínua avaliação entomológica, precisam de um detalhado conhecimento da dinâmica de infestação e reinfestação das diferentes áreas, sobretudo de áreas endêmicas com contínuo histórico de infestação por triatomíneos após as intervenções químicas. Segundo Cécere *et al.* (1999) e Gurevitz *et al.* (2013) o processo de reinfestação por *T. infestans* geralmente deve-se ao tipo e características da construção das infraestruturas presentes nos ambientes intra e

peridomiciliar, os quais proporcionam refúgios e condições ambientais ótimas para a persistência de *T. infestans*. Estas características coadjuvam ao estabelecimento de colônias de triatomíneos residuais, assim como aos provenientes do ambiente silvestre (Silveira & Rezende, 1994; Cécere *et al.* 2006; Vázquez-Prokopec *et al.* 2005; Gurevitz *et al.* 2013; da Rosa *et al.* 2013), colocando em risco todos os esforços alcançados pelo programa de controle.

O controle químico teve bons resultados em grande parte da área de distribuição de *T. infestans*. No entanto, em algumas áreas da Argentina, Bolívia e Paraguai, *T. infestans* apresenta altos índices de reinfestação após o controle químico (Cécere *et al.* 2004; Marcet *et al.* 2008; Gürtler *et al.* 2007; 2009; Germano *et al.* 2012). Esta persistência provavelmente deve-se a baixa estabilidade, baixa eficácia do inseticida aplicado nas estruturas, ou altos níveis de resistência relatados nestas áreas (Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Germano *et al.* 2010; Lardeux *et al.* 2010), o se existiria fluxo populacional entre populações de diferentes estruturas domésticas (intra e peridomésticas) e o possível papel que poderia estar exercendo as populações silvestres no processo de reinfestação das casas tratadas.

Ante esta problemática, é preciso ampliar o conhecimento sobre os processos de infestação por *T. infestans*, e o perfil toxicológico que apresenta as populações domésticas e silvestres presentes em áreas de contínua infestação na Bolívia, uma vez que foram relatados nestas populações diferentes níveis de suscetibilidade a inseticidas. Portanto, o conhecimento da identificação e distribuição de áreas de contínua infestação por *T. infestans* é de suma importância para a avaliação epidemiológica, tomada de novas medidas e estratégias pelos programas de controle.

Neste contexto, o presente estudo pretendeu determinar a infestação e a dinâmica espaço-temporal da reinfestação por *T. infestans* em quatro comunidades do município de Toro Toro (Potosí-Bolívia), assim como a caracterização do perfil de suscetibilidade à deltametrina no período 2014 (antes e oito meses após borrifação).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar o padrão de infestação, o perfil de suscetibilidade e a diversidade genética de *Triatoma infestans* nas comunidades de Taqó Taqó, Julio Chico, Julio Grande e Calahuta do município de Toro Toro (Potosí-Bolívia).

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a infestação por *T. infestans* do município Toro Toro a partir de dados do Programa Nacional de Chagas (2009-2014) e sua correlação com as variáveis ambientais do Bioclim;
- Caracterizar a suscetibilidade a deltametrina em populações de *T. infestans*, provenientes do ambiente silvestre e doméstico (intra e peridomiciliar), nas quatro comunidades de estudo, coletados no ano 2014;
- Estabelecer os padrões da dinâmica espaço-temporal da infestação e a caracterização da variabilidade genética das populações de *Triatoma infestans* nas quatro comunidades de estudo antes e após borrifação no ano 2014;

4. METODOLOGIA

4.1. Área de estudo

O município de Toro Toro (Província Charcas) se encontra localizado ao norte do Departamento de Potosí (Bolívia). O município tem uma extensão de 1.172 km² e apresenta um gradiente de altitude que varia 1900 e 3600 m.s.n.m. De acordo com o relatório do 2015 do INE (Instituto Nacional de Estadística de Bolívia) o município está composto por 73 comunidades com 3.511 moradias e uma população de 12.086 pessoas (Fig. 1).

O município de Toro Toro forma parte das Províncias Biogeográficas Puna e Boliviano-Tucumana, com vegetação potencial de micro-bosques a meso-bosques decíduos e com ocorrência de cactáceas (Antezana & Navarro, 2002; López, 2003). O bioclima predominante nesta área é pluviestacional subumedo-úmido e xérico seco-semiárido (Navarro & Ferreira, 2004).

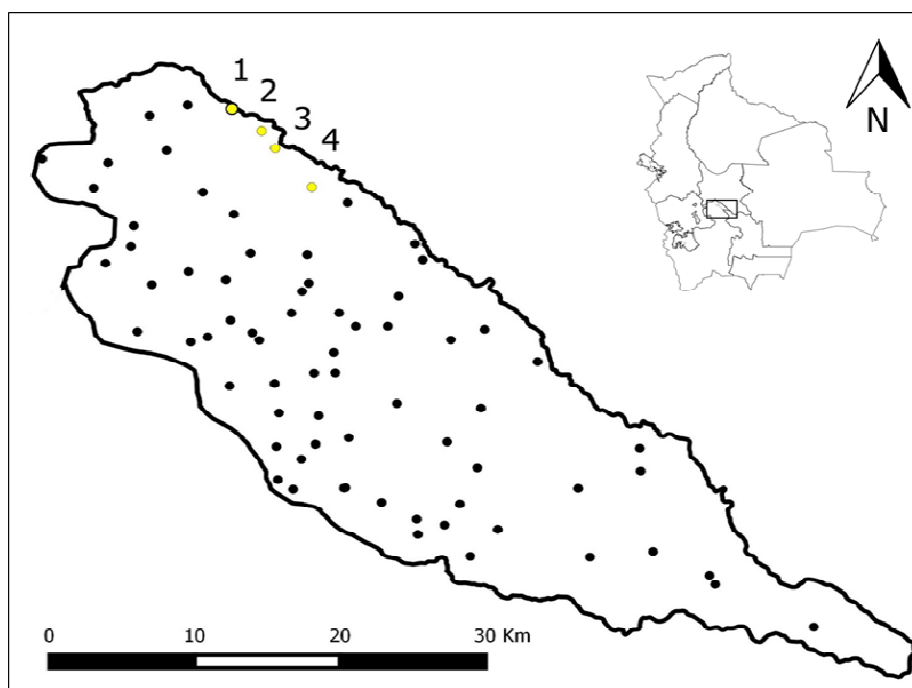


Figura 1. Área de estudo do município de Toro Toro, Potosí-Bolívia.

Em amarelo as comunidades de Taqó Taqó (1), Julo Chico (2), Julo Grande (3) e Calahuta (4).

4.2. Comunidades do estudo

Para o estudo da infestação no período de 2009-2014 foram avaliados os dados disponíveis para todo o município de Toro Toro. As comunidades do município historicamente apresentaram altos níveis de infestação por *T. infestans* e infecção natural por *T. cruzi* (OPS, 2011).

Para o estudo da dinâmica de infestação e reinfestação antes e após borrifação foram selecionadas quatro comunidades do município de Toro Toro: Taqó Taqó, Julo Chico, Julo Grande e Calahuta. A seleção foi baseada na persistente infestação e reinfestação que se apresenta nestas comunidades (PNCCH, 2013), além de serem áreas contiguas o que facilitou o trabalho de campo.

4.3. Padrão de infestação por *T. infestans* no ano 2014

4.3.1. Coleta dos triatomíneos nas unidades domiciliares (UDs), antes e após a aplicação de inseticida.

A busca e coleta de *T. infestans* (inquéritos entomológicos) em todas as UD das comunidades de Taqó Taqó, Julo Chico, Julo Grande e Calahuta (Fig. 2), foram realizadas em duas fases: pre-intervenção com inseticida (Janeiro de 2014) e a segunda oito meses após a intervenção com inseticida (outubro de 2014).

Os inquéritos entomológicos foram realizados com apoio de um técnico do PNCCH de Potosí e uma pessoa da comunidade através da busca ativa de triatomíneos (método Hora/Homem) no intradomicílio e peridomicílio (Currais, galinheiros, chiqueiros, quarto de despejos). Destacando que a última borrifação, por parte do PNCCH, foi realizada no mês de fevereiro de 2014.

Após o enquerito entomológico todas as UD que resultaram infestadas por triatomíneos na primeira fase, foram borrifadas segundo o protocolo do controle de vetores do Departamento de Potosi, utilizando-se Alfacipermetrina 50 mg a.i./m², e uma bomba Hudson X-pertTM de compressão manual.

Foram registradas e consideradas as características de cada local onde foram realizadas a busca (individualmente), como as coordenadas geográficas. Os indivíduos capturados nos diferentes ambientes e/ou ecótopos foram acondicionados em frascos individuais e contabilizados por estágio evolutivo.

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados nas duas fases de coleta (antes e após borrifação com inseticida).

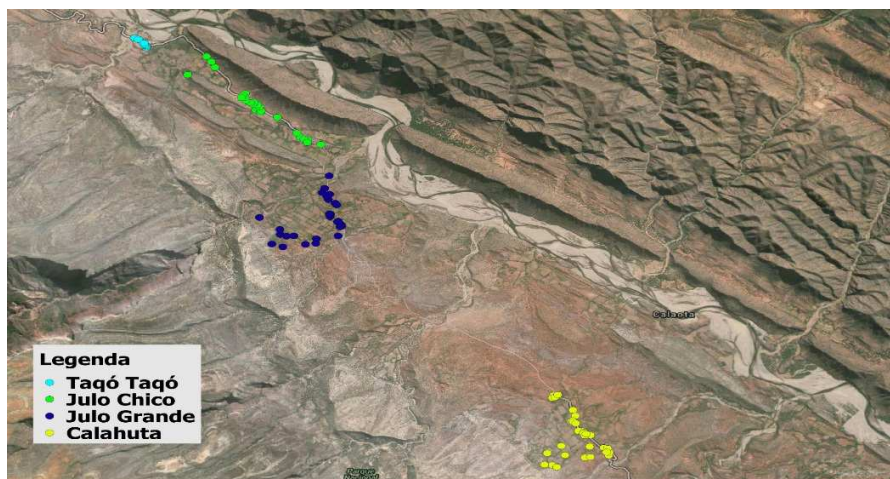


Figura 2. Distribuição das UD's avaliadas (antes e após borrifação), nas comunidades (ver texto). Os círculos indicam a localização das casas nas comunidades, de Taqó Taqó (Azul claro), Julo Chico (Verde), Julo Grande (Azul escuro) e Calahuta (Amarelo).

4.3.2. Coleta dos triatomíneos no ambiente silvestre

A coleta dos triatomíneos no ambiente silvestre foi realizada em dois potenciais ecótopos: um afloramento rochoso localizado na comunidade Julo Chico e um penhasco de rochas na comunidade de Julo Grande (locais onde se tinha suspeita de presença de triatomíneos ou já se tinha coletado anteriormente *T. infestans* por outros grupos de pesquisa) (Figura 3).



Figura 3. Coleta de *Triatoma infestans* em ambiente silvestre das comunidades de Julo Chico (A) e Julo Grande (B).

Foram utilizadas armadilhas com isca viva (camundongos) descrita por Noireau *et al.* (1999; 2002), distribuídas nos possíveis abrigos de triatomíneos, aleatoriamente entre 16:00 e 17:00 horas e coletadas na manhã seguinte de 07:30 e 09:00 horas. Esta armadilha consiste num frasco plástico de 50 cm³, fechada com tela de arame e parcialmente coberta por uma fita adesiva dupla face. No interior do frasco um camundongo com serragem e ração. Um total de 50 armadilhas foram distribuídos em Julo Grande e 15 em Julo Chico por dias em cada local de coleta, em cada fase da pesquisa (janeiro e outubro).

4.3.3. Identificação dos Triatomíneos

Todos os insetos coletados foram identificados utilizando a chave taxonômica de Lent e Wygodzinsky (1979). As ninfas de triatomíneos foram identificadas pela comparação com insetos de coleção.

4.4. Manutenção de colônias

Os triatomíneos coletados foram mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia da Escola Técnica de Saúde Boliviana Japonesa de Cooperação Andina (Cochabamba-Bolívia), em condições de temperatura e umidade controladas (25°C ± 1°C; 60% ±10% UR), e encaminhados ao Brasil; as autorizações para o transporte das amostras foram fornecidas pelo IBAMA-Brasil, realizadas em colaboração com o Instituto de Investigações

Biomédicas e Interação Social (IIBISMED) da Faculdade de Medicina da Universidade Mayor de San Simón (UMSS) e do PNCH da Bolívia em conjunto com o Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR - Fiocruz Minas, Belo Horizonte – MG.

Uma vez transferidas as amostras ao Brasil, os insetos foram mantidos no insetário do Laboratório de Referência em Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas CPqRR/Fiocruz, em condições controladas de temperatura e umidade ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR). Os insetos acondicionados foram alimentados periodicamente (15 dias) com sangue de galinha (*Gallus gallus*) e com camundongos (*Mus musculus*), semanalmente (CEUA N° 41/14-2).

Para os bioensaios de suscetibilidade a deltametrina, ovos foram retirados semanalmente antes de cada alimentação dos triatomíneos, separados em placas de petri individuais identificadas, para serem armazenados e acondicionados em estufa em umidade, temperatura e fotoperíodo controlados de 70% , $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12:12 h (claro, escuro), com objetivo de tornar simultânea a eclosão das ninfas. A eclosão das ninfas foi registrada diariamente para sua posterior retirada das placas de Elisa identificadas, quanto a data de eclosão e a data de aplicação do inseticida. Estes procedimentos visam a obtenção da geração F1 padronizada em relação ao tamanho, idade cronológica e fisiológica, para posterior realização dos ensaios biológicos.

4.5. Dinâmica da infestação por *Triatoma infestans*

Na avaliação da dinâmica de infestação e reinfestação por *T. infestans* foram utilizadas todas as amostras coletadas antes e a pós borrifação, para cada comunidade estudada segundo o esquema já descrito no item 4.

4.5.1. Marcadores microssatélites

A caracterização da estrutura populacional de *T. infestans* foi através do uso de marcadores de microssatélites das amostras coletadas durante o estudo, foram utilizados o protocolo descrito por Marcet *et al.* (2006). Os iniciadores utilizados se encontram apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Loci de microssatélites descritos para *T. infestans* com respectiva sequência dos iniciadores, arranjos de repetição, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento esperado.

Nome do loci	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Arranjo da repetição	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho do Fragmento (pb)	Sonda Utilizada
Tinfest_ms56	F: TTC TTA TTA ACG TAA TCT C R: CGT GTG GTA TAT CTC TC	(CA) ₈ T(AC) ₅	46,3	156 – 170	VIC
Tinfest_ms64	F: CTA CAG AAC AAT TCC CAC R: GCA GGT AAG CTG GGA G	(CT) ₆ (GC) ₄ CT(CA) ₁₃	51,8	146 – 162	NED
Tinfest_ms68	F: GAT TCA TTG TGG CAG GTC R: GCA ATG AAG GAA GAG GAG	(AC) ₅ C(CA) ₆	56	222 – 266	VIC
Tinfest_ms65	F: GCG ATG CGA TTA CAG AGG R: GCT CTG TTC CTA GCT TAC C	(GA) ₁₇	56,5	183 – 191	VIC
Tinfest_ms3	F: GCG GAC TGA GAA AGG AAC A R: TTC ACC GCT CGT CTA CAC AC	(GT) ₁₀ G(GT) ₂ GC(GT) ₂ GG(GT) ₂	58	160 – 204	6-FAM
Tinfest_ms5	F: ATG CTG ATA GTC GCA ACA CG R: TCG ATC TTT TTC CCA AAT CG	(CA) ₂₅	58	364 – 396	6-FAM
Tinfest_ms22	F: CGA GTC AAA TTT TCC ATG AGG R: CCC ATG GTG TTA CCC AAA AC	(TG) ₉	58	162 – 196	NED
Tinfest_ms27	F: ATG AAG CCG AAA CCA CAA AG R: GGG GAA GAG AAT GCA TTG AG	(CT) ₁₃	58	290 - 314	6-FAM
Tinfest_ms42	F: GAC GCT CCA GCT ATC GAT TC R: GGC CAA TTG GTT TGG TAG TG	(AC) ₁₂	58	206 - 246	NED

Nota: **Marcet *et al.* 2006; PB: pares de bases

A extração do DNA foi realizada utilizando kit Wizard (Promega, Medison, Wisconsin) de acordo com recomendações do fabricante. As patas de cada espécime foram retiradas com auxílio de pinça e tesoura, lavados com PBS. A quantificação do DNA extraído foi realizada individualmente em espectrofotômetro NanoDrop 100 (Nanodrop, Bethesd, MD). O material processado esteve mantido a -20 °C até o momento do uso. Foram realizadas oito PCRs, segundo a descrição por Marcet *et al.* (2006) (Tabela 2).

Tabela 2. Detalhamento das PCRs de amostras de *Triatoma infestans* realizadas neste estudo utilizando os marcadores descritos por Marcet *et al.* (2006).

PCR	MIX	Quantidade
1	Buffer 5X	4uL
	Primer (F/R): Tinfest_ms5, Tinfest_ms42	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL
2	Buffer 5X	4uL
	Iniciadores (F/R): Tinfest_ms22, Tinfest_ms27	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL
3	Buffer 5X	4uL
	Iniciadores (F/R): Tinfest_ms03	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL
4	Buffer 5X	4uL
	Iniciadores (F/R): Tinfest_ms56	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL
5	Buffer 5X	4uL
	Iniciadores (F/R): Tinfest_ms64	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL
6	Buffer 5X	4uL
	Iniciadores (F/R): Tinfest_ms65	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL
7	Buffer 5X	4uL
	Iniciadores (F/R): Tinfest_ms68	2uL*
	Taq	0,1uL
	DNA	2uL
	dNTP MIX	2uL

A extração do DNA foi realizada utilizando kit Wizard (Promega, Medison, Wisconsin) de acordo com recomendações do fabricante. As patas de cada espécime foram retiradas com auxílio de pinça e tesoura, lavados com PBS. A quantificação do DNA extraído foi realizada individualmente em espectrofotômetro NanoDrop 100 (Nanodrop, Bethesda, MD).

O material processado esteve mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso. Foram realizadas oito PCRs, segundo a descrição por Marcet *et al.* (2006) (tabela 3).

Para a amplificação foi utilizado um termociclador Veriti 96 (Applied Biosystem®). Após desnaturação do DNA a 95°C por 5 minutos, foram realizados 28 ciclos (94°C por 30 segundos, anelamento por um minuto com temperaturas específicas de cada iniciador, 72°C por 45 segundos) seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a reação de genotipagem foi utilizado o seguinte protocolo: $0,2\text{ }\mu\text{L}$ de padrão (LIZ 500, Applied Biosystem® by Life Technologies), $8,8\text{ }\mu\text{L}$ de Formamida Hi-di (Applied Biosystem® by Life Technologies), $1\text{ }\mu\text{L}$ da PCR na diluição de 1:10. As amostras foram processadas junto a Rede de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ. Os dados foram analisados através do programa Gene Mapper® (DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis).

A diversidade genética dentro de cada população foi quantificada pelo número médio de alelos por locus, a diversidade genética média em todos os locis eo coeficiente de endogamia (FIS). A heterozigosidade média observada e a heterozigose esperada média assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o análise hierárquica da variância molecular (AMOVA), teste do índice modificado de Garza-Williamson (G-W; Garza & Williamson 2001) foi calculado no programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), a fim de testar se as populações definidas sofreram efeito “gargalo de garrafa” (ou efeito bottleneck), onde valores próximos de um são indícios de que a população é estacionária, enquanto valores próximos de zero indicam que possivelmente houve uma drástica redução do tamanho populacional. O Isolamento por Distância foi testado entre comunidades e entre populações, comparando a matriz FST e a matriz de distância geográfica usando um teste de Mantel com 1.000 permutações (Sokal & Rolf 1995).

5. Resultados

ARTIGO 1

Espinoza Echeverría et al. *Parasites & Vectors* (2017) 10:58
DOI 10.1186/s13071-017-1984-0

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access

Spatial and temporal distribution of house infestation by *Triatoma infestans* in the Toro Toro municipality, Potosí, Bolivia



Jorge Espinoza Echeverría^{1*}, Antonio Nogales Rodríguez², Mirko Rojas Cortez³, Liléia Gonçalves Diotallevi¹ and David E. Gorla⁴

Abstract

Background: *Triatoma infestans* is the main vector of *Trypanosoma cruzi* in Bolivia. The species is present both in domestic and peridomestic structures of rural areas, and in wild ecotopes of the Andean valleys and the Great Chaco. The identification of areas persistently showing low and high house infestation by the vector is important for the management of vector control programs. This study aimed at analyzing the temporal and spatial distribution of house infestation by *T. infestans* in the Toro Toro municipality (Potosí, Bolivia) between 2009 and 2014, and its association with environmental variables.

Methods: House infestation and *T. infestans* density were calculated from entomological surveys of houses in the study area, using a fixed-time effort sampling technique. The spatial heterogeneity of house infestation was evaluated using the SaTScan statistic. Association between house infestation with Bioclim variables (Worldclim database) and altitude was analyzed using a generalized linear model (GLM) with a logit link. Model selection was based on the Akaike information criteria after eliminating collinearity between variables using the variable inflation factor. The final model was used to create a probability map of house infestation for the Toro Toro municipality.

Results: A total of 73 communities and 16,489 house evaluation events were analyzed. Presence of *T. infestans* was recorded on 480 house evaluation events, giving an overall annual infestation of 2.9% during the studied period (range 1.5–5.4% in 2009 and 2012). Vector density remained at about 1.25 insects/house. Infestation was highly aggregated in five clusters, including 11 communities. Relative risk of infestation within these clusters was 1.7–3.9 times the value for the regional average. Four environmental variables were identified as good descriptors of house infestation, explaining 57% of house infestation variability. The model allowed the estimation of a house infestation surface for the Toro Toro municipality.

Conclusion: This study shows that residual and persistent populations of *T. infestans* maintain low house infestation, representing a potential risk for the transmission of *T. cruzi* in these communities, and it is possible to stratify house infestation using EV, and produce a risk map to guide the activities of vector control interventions in the municipality of Toro Toro (Potosí, Bolivia).

Keywords: *Triatoma infestans*; House infestation; Chagas disease; Environmental variables

* Correspondence: jorgeespinozaecheverria@gmail.com

¹Laboratório de Referência Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ - MG, Belo Horizonte, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Chagas disease remains one of the most important endemic diseases in the Americas [1]. The main mode of transmission in endemic areas is the vectorial route, by domestic, peridomestic, or sylvatic triatomines [2, 3]. At a global scale, an estimated 7 million people are infected by *Trypanosoma cruzi* [1]. In Latin America, the main vector is *Triatoma infestans*, a species widely distributed on the continent [4, 5], showing high vectorial capacity for the transmission of *T. cruzi*, because of its close association with man [6] and habitation of domestic and peridomestic structures [7].

The historical endemic area of Chagas disease in Bolivia covers around 60% of the country and corresponds to six of its nine Departments. Bolivia had one of the highest rates of house infestation by *T. infestans* and people infection by *T. cruzi* in Latin America [8–10]. The vectorial transmission of *T. cruzi* is almost exclusively due to domestic populations of *T. infestans* [11, 12], and (in some areas) this species was present in more than 98% of houses evaluated in rural and periphery-urban areas [13], before the implementation of the National Program of Chagas disease in the 2000s. The Potosi Department, in the south of Bolivia, is considered one of the poorest (86% poverty), and has precarious housings that favor the establishment and development of triatomines (a scenario generally described in highly endemic areas of Chagas disease) [14–17]. These features are currently responsible for the persistence of *T. infestans* in 20 of the 40 provinces in the municipality of Toro Toro [18].

Within the first two decades after the initiation of the Southern Cone Initiative (INCOSUR) to control the transmission of *T. cruzi* by *T. infestans*, Brazil, Chile, Uruguay and wide areas of Argentina and Paraguay certified the interruption of the vectorial and blood-bank transmission of *T. cruzi* [19]. However, the success of the constant efforts to control *T. infestans* was limited in the Gran Chaco of Argentina, Bolivia and Paraguay and in some areas of the Inter-Andean Valleys of Bolivia [20, 21].

Traditionally, the control programs focus on the interruption of the vectorial transmission using insecticides with residual action (especially pyrethroids) to spray human dwellings and on the interruption of transfusional transmission of *T. cruzi* [22]. The main obstacle for a successful vector control intervention is the reinfestation of domestic and peridomestic structures from residual populations, that have either survived the insecticide treatment, or occupied houses that were not treated for some reason or from wild triatomine populations invading domestic premises [23–25]. Vector control failures due to high levels of insecticide resistance were reported mainly on the border between Argentina and Bolivia, in the biogeographical region of the Gran Chaco [26–28].

Identification of areas with persistent house infestation by the vector is very important for the control program management. The description and modelling of vector infestation distribution at the regional level are important inputs to understand the responses of the vector populations to a broad range of environmental conditions. This study aims at analyzing the spatial and temporal variation of house infestation by *T. infestans* in the municipality of Toro Toro (Potosi, Bolivia) during the period 2009–2014, and its association with environmental variables.

Methods

Study area

The study was carried out in the municipality of Toro Toro (Charcas Province), north of Potosi Department, Bolivia. It has an area of 1,172 km², is inhabited by 12,086 people living in 3,511 houses in 73 communities [17]. Biogeographically, the area is part of the provinces of Puna and Bolivian-Tucuman [29], with an altitude ranging from 1,900–3,600 meters above sea level [30].

Farming is the main form of agriculture in Toro Toro, especially potato production and animal husbandry (cattle, goats, sheep and poultry). Of the total population, 97% are poor and 86% live in extreme poverty [31]. Housing is frequently precarious (81%). Most houses in the municipality are built with adobe, stone, thatched roofs and have dirt floors. Houses in the main town (Toro Toro) are of better quality. The majority of houses in the municipality has some peridomestic structure for the protection of domestic animals (i.e. goat corrals and chicken coops).

House infestation and vector density

The information on house infestation by *T. infestans* was provided by the National Chagas Program of Bolivia (NPCCD), and Health Departmental Service (SEDES Potosi). Between 2009 and 2014 field teams evaluated house infestation in the municipality on an almost yearly basis. Although coverage was not complete, 16,489 house evaluation events were carried out during the period. A few communities were evaluated twice a year (Additional file 1: Table S1). The temporal analysis included estimates of the yearly house infestation recorded in the 73 communities in the municipality of Toro-Toro.

The annual entomological evaluation was carried out by field teams consisting of two technicians that spent 15 min searching inside houses (intradomicile) and peridomestic structures, completing 1-man-hour search on each house, according to standardized procedures of the Pan American Health Organization [32, 33].

House infestation (per year and for the whole study period) was calculated as the number of houses found to contain *T. infestans*, divided by the number of houses evaluated during the 2009–2014 period (Additional file 2:

Table S2). Because houses were evaluated repeatedly during the study period, house infestation estimations might not be independent, and house evaluation within a community not always random. Because of this data feature, we carried out a detailed analysis of data properties (Additional file 3: Table S3), and decided the best option to estimate house infestation was to combine all infested and evaluated houses, by year. After the entomological evaluation, all infested houses were sprayed with alphacypermethrin at a nominal dose of 50 mg active ingredient/m², using Hudson X-Pert™ manual sprayers. If house infestation at the community level was higher than 5%, all houses in the locality were sprayed, as indicated by the PAHO protocol [34, 35]. Annual house and community coverage was calculated as number of evaluated houses (or communities) divided by the number of houses in the community (or the number of communities in the municipality). *Triatoma infestans* density was calculated as the number of insects collected during the active search using the man-hour technique, divided by the number of infested houses.

Data analyses

Data analysis focused on three main aspects of this study: description of house infestation and vector density during the period 2009–2014, detection of spatial heterogeneity of house infestation, and analysis of the association between house infestation and environmental variables.

Annual values of house infestation were calculated and risk of house infestation was compared using odds ratios (OR). Temporal trend in house infestation and vector density was analyzed using a generalized linear model (*glm* package of R 3.3.0) [36] and was compared using the Kruskal-Wallis test.

To analyze the spatial heterogeneity of house infestation, the spatial scan statistic [37], was used to measure possible spatial heterogeneity of house infestation and to detect clusters of significant high house infestation, compared with the regional average. The unit of analysis was the community, the circular shape of the spatial scan was used for cluster detection with a maximum circle size equal to 50% of the whole area, and the Poisson model was selected. Although data on house infestation were collected during 2009–2014, these were aggregated by community and the analysis was carried out as an atemporal, pure spatial process [38].

The association between house infestation by community and environmental variables was studied using a generalized linear model with a logit link. Environmental variables included the Bioclim set (Bio1 to Bio19) and altitude (i.e. 20 environmental variables) contained in the Worldclim database (<http://www.worldclim.org/>) [39] at 1 km² spatial resolution. Bio1 to Bio9 include variables related to temperature, whereas Bio10 to Bio19 include variables related to rainfall.

Collinearity between environmental variables was estimated through the variance inflation factor (vif). Only environmental variables with vif < 10 (non-linearly related) were used to fit the final model. The model was used to produce a surface of estimated probability of house infestation in the study area using the *raster* package in R.

Results

Temporal and spatial analysis of house infestation and insect density

House evaluation coverage within communities was relatively low, ranging from 30.8% (2012) to 65.6% (2013), whereas community coverage was higher, ranging between 45.2% (2011) and 80.8% (2009) during the study period (Table 1). A total of 16,489 house evaluation events were carried out over the 73 communities of Toro Toro from 2009 to 2014, giving an overall average of 0.78 house evaluations per house/year. Among these evaluation events, 480 gave positive results for the presence of *T. infestans*, giving an overall house infestation for the municipality of 2.9% during the studied period. Annual values of house infestation varied between 1.5% (2009) and 5.4% (2012) (Fig. 1). Compared with 2009 values, house infestation risk (measured by OR) was between 1.68 and 3.88 times higher in the following years, except in 2011, when infestation risk was similar to 2009 (Table 1).

Vector density varied between 1.1 and 3.2 insects per infested house (2009 and 2012, respectively). Although higher density was observed during 2011 and 2012, vector density remained at about 1.25 insects per infested house. Density in intradomestic structures was about 7 times lower (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 50.75$, $df = 1$, $P < 0.0001$) than density in peridomestic ones. Of the recorded infested houses, only 10% (48 out of 480) were colonized with nymphs, whereas the other harbored only adults.

House infestation was not homogeneously or randomly distributed in Toro Toro, but showed an aggregated

Table 1 Community coverage (CC), house coverage (HC), number of house evaluations (HE) and house infestation (number of positive houses) by *T. infestans* in the study area between 2009 and 2014

Year	CC (%)	HC (%)	HE	No. of infested houses (%)	OR (95% CI) ^a	Density	
						ID	PD
2009	80.8	56.2	1,391	52 (1.5)	–	0.37	0.71
2010	65.7	37.9	2,287	90 (3.9)	2.63 (1.86–3.72)*	0.21	0.94
2011	45.2	41.6	2,510	49 (1.9)	1.28 (0.86–1.89)	0.67	2.53
2012	46.5	30.8	1,858	106 (5.4)	3.88 (2.77–5.44)*	0.24	1.56
2013	76.7	65.6	3,958	101 (2.5)	1.68 (1.19–2.36)*	0.04	1.65
2014	57.5	41.1	2,485	82 (3.2)	2.19 (1.54–3.11)*	0.04	1.38

^a $P < 0.05$

^bodds ratio, compared with infestation in 2009

Abbreviations: CI confidence interval, ID intradomestic, PD peri-domestic

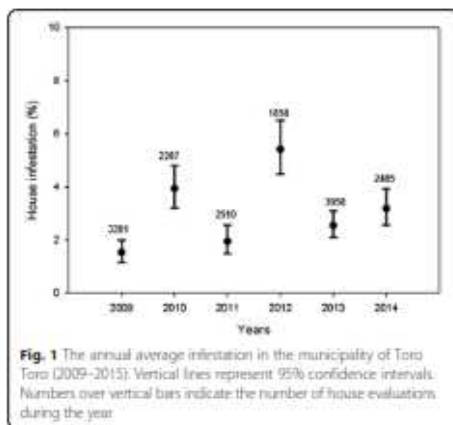


Fig. 1 The annual average infestation in the municipality of Toro Toro (2009–2015). Vertical lines represent 95% confidence intervals. Numbers over vertical bars indicate the number of house evaluations during the year

spatial distribution, with five significant community clusters of high house infestation (Fig. 2). These clusters grouped 4,359 of 16,489 house evaluation events from 11 of 73 communities in the municipality and showed values of house infestation between two and three times higher than the average house infestation (Table 2).

House infestation and environmental variables

Four environmental variables proved to be good descriptors of house infestation in the study area. The glm produced a significant model that explained 57% of the variation, with an AIC of 391.58 with four environmental variables: mean diurnal temperature range (Bio2), temperature seasonality (Bio4), minimum temperature of

Table 2 High house infestation aggregates (clusters) in the rural communities of the municipality of Toro Toro

Clusters	Communities	Infestation % (CP/CE)	Relative risk
1	Calahuta, Hacienda Loma, Yehuyallani, Sucusuma	7.1 (131/1,852)	2.9
2	Omereque, Paloma Pampa	8.3 (46/566)	2.8
3	Julo Chico, Julo Grande, Kinusmayu	4.9 (82/1,650)	1.8
4	Agua Calientes	7.6 (30/390)	2.7
5	Quoma	7.1 (13/184)	2.6

Abbreviations: CE number of house evaluations, CP number of infested houses

the coldest month (Bio6) and precipitation of the coldest quarter (Bio19). A second model that only included the minimum temperature of the coldest month was also significant and showed as the second best model describing house infestation explaining 53% of the variation, with an AIC of 405.4. Although statistically different from the first model, this univariate model showed little difference of AIC and residual deviance values. No house was found infested in communities with temperature of the coldest month below 0 °C. Figure 3 shows the observed dispersion diagram between temperature of the coldest quarter and house infestation, whereas Table 3 reports on parameter estimates for both models. Using the estimated four-variable model mentioned above, and rasters of the four selected environmental variables, an estimated surface of house infestation was calculated for the municipality

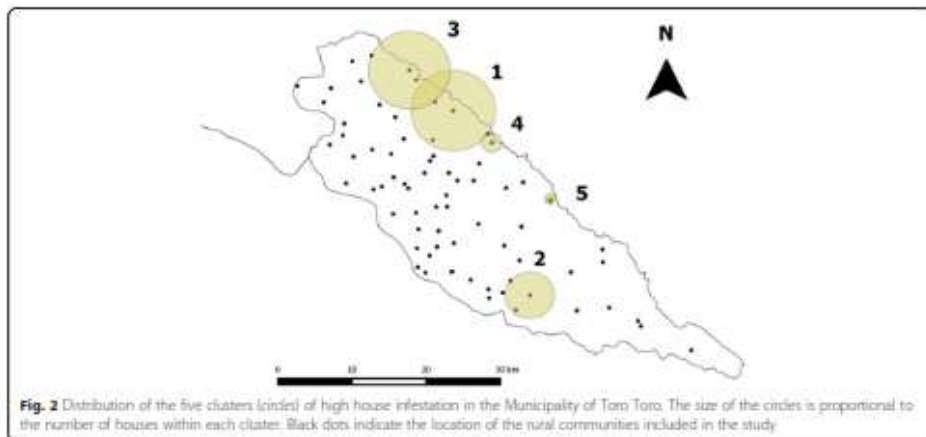
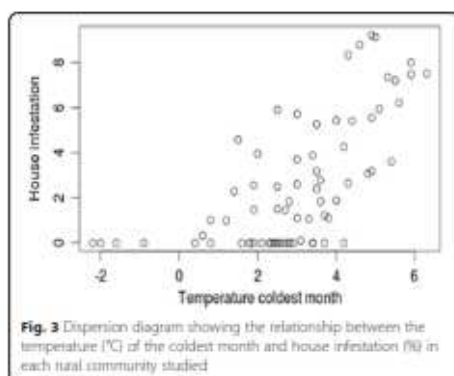


Fig. 2 Distribution of the five clusters (circles) of high house infestation in the Municipality of Toro Toro. The size of the circles is proportional to the number of houses within each cluster. Black dots indicate the location of the rural communities included in the study



(Fig. 4). The estimated surface shows the spatial heterogeneity of house infestation, with higher values in the northern limit of the municipality, and along the southern hillsides and valleys towards the southeast.

Discussion

Reports on house infestation by triatomines in Bolivia date back to pre-Columbian times [11, 40]. Indices reported in rural areas (70–100%) were higher than those reported in peri-urban areas (40–60%) [41, 42]. From 2000 onwards, a considerable reduction of house infestation by *T. infestans* was attained in Bolivia. However, only the Departments of La Paz and Potosí were certified free of vectorial transmission [1, 18], although the species persists in reduced population remnants throughout these Departments.

Within highly endemic provinces in the Department of Potosí, the municipality of Toro Toro (Charcas Province) draws attention due to the extreme poverty in the region [18, 31] and precarious housing, which generally favor the establishment and development of domestic triatomines. Such a scenario is typical in highly endemic areas [14, 15]. Before the intervention of the vector control program in

Table 3 Estimated parameters of the generalized linear model for house infestation by *T. infestans* based on four environmental variables ($P < 0.05$). Null deviance: 497 on 72 degrees of freedom; residual deviance: 213.61 on 68 degrees of freedom; AIC: 391.58

Variable	Estimate	Standard Error	Pf(> p)
Intercept	-1.88	2.57	0.59
Bio 2 Mean diurnal temperature range	-0.04	0.02	0.05
Bio 4 Temperature seasonality	1.71e ⁻⁶	4.0e ⁻³	1.39e ⁻⁶
Bio 6 Minimum temperature of the coldest month	0.03	7.11e ⁻³	6.86e ⁻³
Bio 19 Precipitation of the coldest quarter	-0.04	0.02	7.92e ⁻³

2000, the municipalities of the Potosí Department showed house infestation of up to 75%, which can be considered high when compared to current estimations [18].

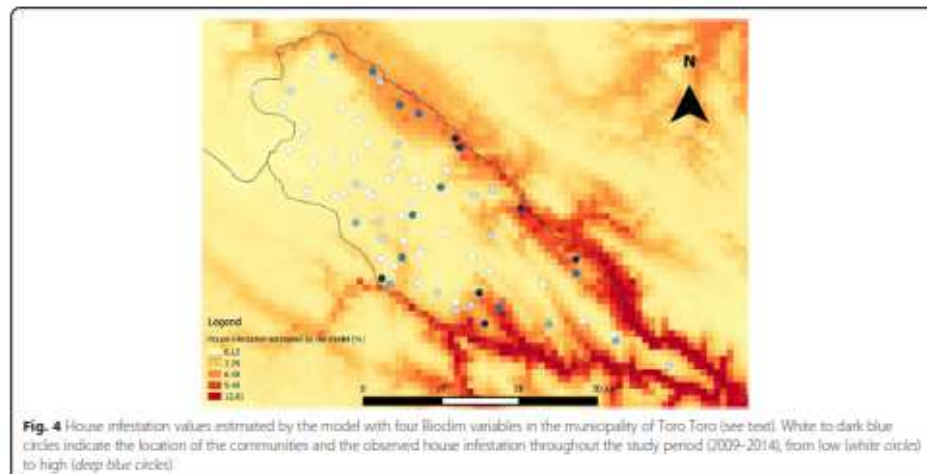
In this study, we estimated that on average, the domestic infestation between 2009 and 2014, in 73 communities in the municipality of Toro Toro was 2.9%, similar to domestic infestation observed in the neighbor Department of Cochabamba between 2004 and 2011, where after a chemical intervention, the domestic infestation indices were 2–3% [43]. In other areas, outside the Andean valleys, within the Bolivian Chaco, the household infestation after intervention with insecticides dropped to 1.7% [44].

Comparing house infestation at the beginning of the study period (2009), the risk was always higher in subsequent years (odds ratios between 1.68 and 3.88), except for 2011. The lowest and highest value of annual infestation in the Toro Toro municipality were observed in 2009 and 2012. This variation could be the result of differences in the number of communities covered by the control program (80.2% in 2009 and 46.5% in 2012), and probably because in these communities only 56.2 and 30.8% of the houses were evaluated each year.

Despite the great effort by the vector control program, it is not always possible to cover all of the communities or houses. Low coverage can be attributed to the difficulties accessing certain communities, the absence of owners at the time of the evaluation, or other high priority endemic diseases draining personnel and/or funding. Beside low coverage, vector control efficacy could also be related to the vectors low susceptibility to pyrethroids. Although variable, house infestation by *T. infestans* in Toro Toro remains low (an overall 2.9%), but similar to those for houses in the neighbor regions of Potosí and Cochabamba.

It is important to emphasize that house infestation indices in the municipality before the establishment of the vector control program were as high as 80% [18]. As a consequence, high prevalence rates of Chagas disease were recorded in different age groups of the affected communities [12]. According to our results, house infestation remains low; however, a latent risk of *T. cruzi* transmission remains in these communities due to the persistence of *T. infestans* in both intra- and peridomestic structures. As such, it is important to maintain up-to-date knowledge of vector numbers, the cause(s) of the persistence of the house infestation, and control activities.

The low density of *T. infestans* in domestic environments observed during this study may be due to house construction material(s) [45, 46], the size of the dwelling and the number of individuals per room, the presence of domestic animals [47–49] and the use of household insecticides [46]. Higher densities of triatomines observed in the peridomestic may be due to the numerous structures (i.e. goat corrals and chicken coops) that create favorable microclimatic conditions for *T. infestans* [50, 51]



by providing refuges and oviposition sites [46, 48], and refuges from insecticides.

The pattern of house infestation within the studied communities was highly clumped, heterogeneously distributed throughout the municipality of Toro Toro. The infestation clusters including 11 communities showed house infestation ranging from 7 to 8%. The spatial analysis of house infestation by *T. infestans*, as shown here, helps in the stratification of risk in rural communities of endemic areas. The identification of risk factors and spatial heterogeneity over wide geographical areas [52, 53], as used in studies of various disease vectors, may help to improve the efficacy and efficiency of vector control program [54–56].

The identified clusters of high house infestation could encompass high risk transmission areas, and should receive special consideration, and possibly more resources, by the vector control program. The relatively high infestation indices recorded in these geographical clusters could be due to various factors such as poverty, economic activities performed to sustain the household (animal husbandry), and local farming habits (special arrangement of peridomestic ecotopes, such as chicken coops and corrals). Low educational level of the population, unawareness of the vector presence risk, the efficacy of the vector control interventions, environmental factors, and potentially the presence of pyrethroid-resistant populations could also account for the observed outcome. According to the observations by Porcasi et al. [57], a number of these factors played an important role in the presence and extension of the high infestation clusters in the Argentine Chaco region. Similar factors

could be contributing to the persistence and house infestation by *T. infestans* in the studied communities within Toro Toro.

The variables of the Bioclim dataset allowed the characterization of habitats within the environmental hyperspace inhabited by a species [58] and are commonly used to identify, and predict insect distribution areas for individual species [59]. The environmental analysis showed that two alternative models are able to describe the house infestation in the area. The best of the two models explained 57% of the variation, with four variables: two related to temperature and two to precipitation. The second model explained 53% of the variation, with only one variable, the minimum temperature of the coldest month, a similar finding to the one reported for the geographic distribution of *T. infestans* in the southern cone of South America [52].

Conclusions

This study shows the importance of spatial analysis of the persistence of house infestation by *T. infestans* that obliges the maintenance of the vector vigilance and control activities, as well as the identification for the causes of the persistence of this house infestation. The effort to maintain vigilance and control could be efficiently organized following the results reported in this study that helps to spatially stratify the transmission risk over the communities of Toro Toro. This risk stratification could guide the differential assignment of resources by the public health agency of Potosí.

Additional files

- Additional file 1: Table S1.** Number of localities evaluated once or twice a year during the study period. (XLSX 22 kb)
- Additional file 2: Table S2.** Number of evaluated houses varied within and between years. (XLS 19 kb)
- Additional file 3: Table S3.** Number of evaluated and infested houses according to each of the three methods described above. (XLS 22 kb)
- Additional file 4: Figure S1.** House infestation estimated by four alternative methods, based on different assumptions (see text). Blue rectangle: all yearly sample data aggregation, red diamond: highest yearly sample size, yellow triangle: maximum yearly infestation sample, green triangle: first yearly evaluation. (TIF 3074 kb)
- Additional file 5:** Supporting information (DOC 32 kb)

Abbreviations

CC: Community coverage; CE: Number of house evaluations; CI: Confidence interval; CP: Number of infested houses; EV: Environmental variables; GLM: Generalized linear model; HC: House coverage; HE: House evaluations; HE: House infestation; ID: Intradomestic; NPCCD: National Chagas Programme; ns: Not significant; OR: Odds ratio; PAHO: Pan American Health Organization; PD: Peridomestic; SE: Standard error; SEDES: Health Departmental Service; vif: Variance inflation factor

Acknowledgments

This study was supported by the Project ONP/process N° 400526/2013-9 Investigador Visitante Especial - PVE and PEC-PG Cipev/Brazil through granting of a doctoral scholarship (13254-12-7) to Jorge Espinoza Echeverría. We thank the National Chagas Disease of Bolivia and Mirelmy Bustamante Gomez.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included within the article and its Additional files 1, 2, 3, 4 and 5.

Authors' contributions

All authors have contributed substantially to this study. Concealed the study: JEE, DEG, LGD. Acquisition and completion of the data: JEE, ANR, MRC. Analyzed and interpreted the data: JEE, DEG. Wrote the paper: JEE, LGD, DEG. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Author details

¹Laboratorio de Referência Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ- MG, Belo Horizonte, Brazil. ²Servicio Departamental de Salud - Potosí, Programa Nacional de Chagas, Potosí, Bolivia. ³CEADES Salud y Medio Ambiente /Plataforma Chagas, Cochabamba, Bolivia. ⁴Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Córdoba, Argentina.

Received: 6 August 2016 Accepted: 12 January 2017

Published online: 02 February 2017

References

- World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates [cited 2013 Jun 2]. <http://www.who.int/wer/2013/wer3006/en/>.
- Zelenski R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In: Elliot R, O'Connor M, Wolstenholme GF, editors.

- Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Amsterdam: Associated Scientific Publishers; 1974. p. 21–77.
- Carvajal de la Fuente AL, Yádon ZB. A Scientific review evaluation of the Chagas disease implementation research programme of the PAHO and TDR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11):e2440.
- Linn H, Wygodzinski P. Revision of the triatomine *Hemiptera, Reduviidae*, and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;103:125–320.
- Soto-Vivas A. Clave pictórica de triatomíneos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. *Bol Med Salud Amb*. 2009;49(2):259–74.
- Finatiro CP. Biogeografía, origen e distribuição da domesticação de triatomíneos no Brasil. *Rev de Saude Publ*. 1980;14:205–99.
- Germaco M, Picollo M, Spillmann C, Mougabure-Cueto G. Feritofthors: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in northern Argentina. *Med Vet Entomol*. 2014;28(1):21–5. doi:10.1111/mve.12014.
- Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transdomestic transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;98(5):577–91.
- Cortez MR, Emperaire L, Piccolini RV, Gürtler RE, Torrico F, Jaramán AM, Nicreau F. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta Trop*. 2007;102:47–54.
- Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCCh). Anuario Programa Nacional de Chagas Bolivia. La Paz Estado Plurinacional de Bolivia Ministerio de Salud y Deportes Dirección General de Servicios de Salud Unidad de Epidemiología Programa Nacional de Chagas 2008.
- Romella C. Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: López Liberos; 1963.
- Gullén G, Diaz R, Jermol A, Cassab JA, Pinto CT, Schofield CJ. Chagas disease vector control in Tupiza, Southern Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92:1–8.
- Valencia Telleña A. Investigación epidemiológica nacional de la enfermedad de Chagas. La Paz: Ministerio de Previsión Social y Salud Pública; 1990. p. 184.
- Juregui L. Aspectos epidemiológicos y clínicos de la enfermedad de Chagas en el Departamento de Santa Cruz: La Paz: La reunión Nacional sobre la enfermedad de Chagas 1974.
- Ribera B. Aspectos socioeconómicos y culturales de la enfermedad de Chagas. *Am Soc Bol Med Trop*. 1983;1–6.
- Programa Nacional de Control de Chagas-Ministerio de Previsión Social y Salud Pública (PNCCCh-MPSSP). Hacia una acción integral y sistémica para el logro de un desarrollo de salud. In: 1991. Ed: Programa Nacional de control de Chagas-Ministerio de Previsión Social y Salud Pública República de Bolivia; 1991. p. 25.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). Censo de Población y vivienda. 2015. <http://www.inec.gov.bo>. Accessed 20 Feb 2015.
- Organización Panamericana de Salud. VIII Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Subregional Cono Sur de Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Transmisión Transdoméstica de la Tripanosomiasis Americana, Cochabamba, Bolivia, 2008. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_avalaged&Itemid=270. Accessed 20 Feb 2014.
- Schofield CJ, Jamin L, Lavarela R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006;22(12):583–8.
- Gürtler RE. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:52–9.
- Germaco MD, Picollo M, Mougabure-Cueto GS. Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta Trop*. 2013;28(10):561–5.
- Diaz JCF. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transdomestic Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:11–8.
- Cecere MC, Vázquez-Prokopcov GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Zaitsev JE, Zaidenberg M, et al. Comparative trial of effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of *Triatoma infestans* in northwestern Argentina. *J Med Entomol*. 2006;43(1):902.
- Vázquez-Prokopcov GM, Cecere MC, Canale GM, Gürtler RE, Nitron U. Spatiotemporal patterns of infestation by *Triatoma guayanae* (Hemiptera: Reduviidae) in a rural community of northwestern Argentina. *J Med Entomol*. 2000;42(4):571–81.
- Gurevitz JM, Gaspe MS, Enriquez GF, Provedo YM, Nitron U, Gürtler RE. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease

- vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e2158.
36. Picollo M, Vasena C, Sarto Orihuela P, Reinos S, Zetserberg M, Zerba E. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol*. 2002;40(6):637–42.
 37. Lardou F, Depelere S, Duchon S, Chaves T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Trop Med Int Health*. 2010;15(8):1037–48.
 38. Germano M, Sarto Orihuela P, Roza-Acovedo G, Tolosa A, Vasena C, Picollo M, Mougabue-Custo G. Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2012;49(6):1305–10.
 39. Navarro G, Maldonado M. Geografía ecológica de Bolivia: Vegetación y ambientes acuáticos. In: Navarro G, Maldonado M, editores. Centro de Ecología Simón I. Patiño. Cochabamba: Departamento de Difusión; 2002. p. 343–431.
 40. Torrico M, Lara R. Parque Nacional Toro Toro: Una guía para su interpretación. La Paz: ACT, Ronald Admayer, LIDEMA; 2000.
 41. USDA-Bolivia. Proyecto integrado de seguridad alimentaria / US/AD BOL/MA, EDH42-00-00005-00. 2011. http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/P00277.pdf. Accessed 25 Feb 2014.
 42. Silveira AC, Sanchez O. Guía para muestreo en actividades de vigilancia y control vectorial de la enfermedad de Chagas. 2005. http://www.paho.org/una/index.php?id=57&option=com_docman&task=doc_view. Accessed Feb 2011.
 43. Programa Nacional de Control de Chagas-Escuela Epidemiológica, Ministerio de Salud y Deporte (MNSD). Manual de Operaciones de Campo. In: 2000. Ed: Programa Nacional de control de Chagas- Ministerio de Salud y Deporte, La Paz-Bolivia. 2000. p. 33.
 44. Organización Mundial de la Salud. Enfermedad de Chagas serie de informes técnicos N°202. 1960. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37034/1/WHO_TIS_202_spa.pdf. Accessed 12 June 2014.
 45. World Health Organization (WHO). Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. 2006. http://whqlibdoc.who.int/iq/2006/WHO_CDS_RTD_WHOPEI_GCDPP_2006_1_eng.pdf. Accessed 25 June 2015.
 46. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2013. Document freely available on the Internet at: <http://www.r-project.org>. 2015.
 47. Kulldorf M. A spatial scan statistic. *Commun Stat Theory Methods*. 1997; 26(5):1481–96.
 48. Gorla DE, Porcasi X, Herber H, Catalá SS. Spatial stratification of house infestation by *Triatoma infestans* in La Rioja, Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(4):5–9.
 49. Higgins RJ, Cameron SE, Para JL, Jones PG, Jarvis A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol*. 2005;25:1965–78.
 50. Guzmán RZ. Historia de la enfermedad de Chagas. *Gac Med BolMans*. 2007;70:73.
 51. Arias A, Báldezarra F, Bermudez H, Navin T, Ormsby G, Torrico F, Velarde R. Trabajo de la SNE CCA-programa piloto de control de Chagas. La Paz: Ministerio del Desarrollo Humano, Secretaría Nacional de Salud; 1994.
 52. Ministerio de Salud y Prevención Social (MSP). (MNSD) PNAIDPyCdeIC. Estrategia de información, educación y comunicación del programa de Chagas. 2003.
 53. Espinoza M, Samiá R, Abad-Franch F. Chagas disease vector control in a hyperendemic setting: the first 11 years of intervention in Cochabamba, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2783.
 54. Gorla DE, Ortiz RV, Catalá SS. Control of rural house infestation by *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco using a microencapsulated insecticide formulation. *Parasit Vectors*. 2015;8:255.
 55. Schöfeld CJ, Manden PD. The effect of wall plaster on a domestic population of *Triatoma infestans*. *Bull Entomol*. 1962;16(3):61–69.
 56. Gómez M, Gürtler R, Chuit R, Cohen J. Factors limiting the domestic density of *Triatoma infestans* in north-west Argentina: a longitudinal study. *Bull WHO*. 1998;76(4):373.
 57. Gürtler RE, Cecere MC, Rubel DN, Schwabmann N. Determinants of the domiciliary density of *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Med Vet Entomol*. 1992;6:73–83.
 58. Gurevitz JM, Ceballos LA, Gaspe MS, Alvarado-Chegal JJ, Enriquez GF, Kitron U, Gürtler RE. Factors affecting infestation by *Triatoma infestans* in a rural area of the humid Chaco in Argentina: a multi-model inference approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(10):e1349.
 59. Gaspe MS, Provenza YM, Cardinal MN, Fernández M, Gürtler RE. Ecological and sociodemographic determinants of house infestation by *Triatoma infestans* in indigenous communities of the Argentine Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e100414.
 60. Lorenzo MG, Lazzari CR. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Trop*. 1999;72(1):241–9.
 61. Sandoval CM, Cardenas R, Morales AJR, James E, Mendez JG. Medio ambiente y protozoos vectoriales II. Los vectores de la enfermedad de Chagas y su asociación con los factores climáticos. *Academia*. 2006;3:665–74.
 62. Gorla DE. Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ecol Austral*. 2002;12:117–27.
 63. Reisen WK. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu Rev Entomol*. 2010;55:461–83.
 64. Ruiz MO, Tedesco C, McTighe TJ, Austin C, Kitron U. Environmental and social determinants of human risk during a West Nile virus outbreak in the greater Chicago area, 2002. *Int J Health Geogr*. 2004;3:8.
 65. Diak-Wasser WA, Brown HE, Andreadis TG, Fish D. Modeling the spatial distribution of mosquito vectors for West Nile virus in Connecticut, USA. *Vector-Borne Zoon Dis*. 2005;6:283–93.
 66. Palenzuela M, Arandí P, Marijuán R. Spatial cognition: a geospatial analysis of vector-borne disease transmission and the environment, using remote sensing and GIS. *Information Systems. Inter J Manag Res*. 2014;13(3):39–54.
 67. Porcasi X, Catalá SS, Herber H, Scavuzzo MC, Gorla DE. Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in southern area of Gran Chaco in Argentina. *J Med Entomol*. 2006;43(5):1000–7.
 68. Elith J, Graham C, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, et al. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Biography*. 2006;28(1):29–31.
 69. Booth TH, Ni H, Busby JR, Hutchinson MF. BIOCLIM: the first species distribution modelling package: its early applications and relevance to most current MAXENT studies. *Divers Distrib*. 2014;20:1–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ARTIGO 2

Echeverría et al. *Parasites & Vectors* (2018) 11:92
 DOI 10.1186/s13071-018-2663-5

Parasites & Vectors

RESEARCH

Open Access



Resistance to deltamethrin by domestic and wild *Triatoma infestans* populations in the municipality of Toro Toro, Potosí, Bolivia

Jorge Espinoza Echeverría^{1*}, Marinely B. Bustamante Gomez¹, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa¹, Mirko Rojas Cortez², Antonio Nogales Rodriguez³ and Liléia Gonçalves Diotaiuti¹

Abstract

Background: Chemical control with pyrethroid insecticides has been effective in reducing endemic areas of distribution of *Triatoma infestans* in the Southern Cone, as well as Bolivia; this had considerably reduced the infestation of households in a large part of the territory. Nowadays, areas such as the Chaco and the Inter-Andean Valleys are regions where the reach of vector control strategies is becoming limited, and infestations of insecticide-treated households are reported more often. The objective of this study was to determine if the persistence of *T. infestans* stems from changes in the susceptibility of its toxicological profile in four communities in the municipality of Toro Toro, Potosí, Bolivia.

Methods: Susceptibility to deltamethrin of wild and domestic populations of *T. infestans* was evaluated in two stages (16 populations before and 13 populations after spraying) among DUs (structures in the intra- and peridomicile) and wild ecotopes, in four communities. Serial dilutions of deltamethrin in acetone (0.2 µl) were applied topically on standardized first-stage nymphs. Dose-response results were analyzed with the software PoloPlus and the relationships between lethal doses (LD) and resistance ratios (RR₅₀) were determined.

Results: Different degrees of RR₅₀ were detected among the populations before and after spraying (25.66–54.70 and 21.91–40.67, respectively), as well as in different ecotopes within a DU (DU JC 3, 28.06–36.13, in mixed structures of corals and chicken coops; and DU JG 3, 46.27–25.70, in kitchen roofs), or in the wild environment of the community JG Sil (29.21–40.67). The mortality of insects undergoing diagnostic dose (DD) was never higher than 34%.

Conclusion: The results obtained in this study showed resistance of *T. infestans* to deltamethrin in four communities, hence the complexity of this phenomenon is not only limited to the level of communities, but also applies to the microgeographical level, as in different ecotopes present within the DUs. This phenomenon should be considered while planning the activities of control programs.

Keywords: *Triatoma infestans*, Bolivia, Chagas disease, Insecticide resistance, Deltamethrin, Macro- and microgeography

Background

Chagas disease is an important parasitic infection in Latin America, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, mainly transmitted to humans and mammals by blood-sucking triatomine insects [1, 2]. *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) is widely distributed in South America [3] and is the main vector species within the

endemic area of Bolivia [4–6]. Insecticides play a central role in controlling major vectors of diseases [7]; control programs in Southern Cone countries focus on the interruption of human *T. cruzi* transmission by *T. infestans*, with the application of residual insecticides [8, 9], mainly pyrethroids (particularly deltamethrin) [10–12], because of their efficacy, persistence and low environmental impact [1, 13]. But, chemical control was only partially successful in eliminating domestic triatomine infestation.

Resistance to pyrethroids in triatomines has been detected in South America since the 90s [14–16]. High levels of resistance to pyrethroids, detected in *T. infestans*

* Correspondence: jorgeespinozaecheverria@gmail.com

¹Laboratório de Referência Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-M G, Belo Horizonte, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article.



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

in certain areas of Argentina and Bolivia, were attributed to possible failures of control programs [17–21]. In the Chaco region, the success of insecticide control campaigns in rural communities is limited by early reinfestation, apparently originating from residual peridomestic foci [5, 22]. Peridomestic sites are the first to be recolonized, sustain dense populations of *T. infestans*, and increase the risk of domestic reinfestation in rural northern Argentina [22, 23].

The municipality of Toro Toro (Department of Potosí) is situated in the Bolivia Inter-Andean Valleys. Before the beginning of the Chagas programme in this department, high infestation rates of *T. infestans* were present. After approximately 15 years of chemical control, the density of *T. infestans* decreased and achieved a compatible level with the vigilance phase [6]. Nevertheless, *T. infestans* persists, and it was not known if this was due to operational failures or to susceptible alterations.

Considering previous reports on the different levels of *T. infestans* resistance in different geographical areas of Bolivia [18, 20, 24–27], the objective of this study was to determine if the origin of *T. infestans* persistence was due to alterations of susceptibility in four communities of the municipality of Toro Toro. Response to insecticide was measured and compared among the different environments (intra, peridomestic and wild environment).

Methods

Study area

The study was carried out in the communities of Taqó Taqó (TQ), Julo Chico (JC), Julo Grande (JG) and Calahuta (CA) of the municipality of Toro Toro (Charcas Province), north of Potosí Department, Bolivia. This area is part of the Bolivian-Tucuman biogeographical province [28, 29]. These communities were historically characterized by high rates of house infestation and high triatomine densities. Since 1995, the infestation has decreased and the area has been under vigilance with irregular control activities using alphacypermethrin. The last insecticide spraying campaign occurred the first quarter of 2013 [30].

In these communities farming is the main form of sustenance, especially guava, lemon and also sweet potato production and animal husbandry (cattle, goats, sheep and poultry). The cultivated areas are restricted and very close to the houses, with a very limited production. Housings are frequently precarious and are built with adobe, stone and the majority of houses have some peridomestic structure to protect the domestic animals (i.e. goat corrals and chicken coops).

A domiciliary unit (DU) was defined as the house (i.e. domestic sites) and structures included within the peridomestic area (e.g. kitchens, corrals, chicken coops); all 95 DU existing were georeferenced and numbered in the four communities TQ (10), JC (25), JG (28) and CA

(32). The distances among the communities are between 3–7 km.

The capture of triatomines was carried out in two periods in 2014, January and October (8 months after chemical intervention) by a team composed by two technicians, searching inside houses (intradomicile and peridomestic structures), according to standardized procedures of the Pan American Health Organization [31, 32]. The triatomines were separated in plastic bottles by DUs and ecotopes, and subsequently reared in the laboratory for future analysis.

After the entomological evaluation in the four communities of municipality of Toro Toro, all infested DUs were sprayed with alphacypermethrin at nominal doses of 50 mg a.i./m², using Hudson X-pert™ manual sprayers, as indicated by the Pan American Health Organization protocol [33].

In parallel to the capture of domestic triatomines, wild populations were collected using traps described by Noireau et al. [34, 35] in ecotopes where the presence of wild triatomines was suspected, in parallel with the capture in the houses. The distance of the sylvatic ecotopes and the nearest houses was between 50–100 m for JC and JG, respectively. The number of traps varied depending on the available sampling area. A total of 30 traps (15 per evaluation) and 100 traps (50 per evaluation) were placed in Julo Chico and Julo Grande, respectively.

All insects collected were identified by using the taxonomic key of Lent & Wygodzinsky [3] and maintained under controlled conditions of temperature and humidity (25 °C ± 1 °C; 60% ± 10% RH).

Chemicals

Deltamethrin technical grade (99.1%), obtained from Bayer CropScience (Brazil), was used for the bioassay, following the routine of "Monitoring Network for Triatominae Insecticide Resistance", FIOCRUZ [36]. The acetone analytical grade used for dilutions was purchased from Merck, Germany. To test the susceptibility to insecticide, the triatomine colonies were founded after each phase of the work from a minimum of five insects [37] captured in the two phases of the work described in Table 1.

Bioassays

Although the chemical control in the municipality of Toro Toro is performed with alphacypermethrin, in the present work bioassays were realized using deltamethrin as reference insecticide, following the routine of the Laboratory of Reference in Triatomines and Epidemiology of Chagas Disease, FIOCRUZ, Belo Horizonte. Reference Center in Triatomine Resistance Studies for the Brazilian Ministry of Health and is recognized as a Collaborator Center for WHOPES.

Table 1 Number of *T. infestans* captured in the domestic and sylvatic ecotopes, in four communities of Toro Toro, Potosí, Bolivia, before and after spraying (January and October 2014)

Community	Houses		Before spraying			After spraying		
	No. visited	No. positive	Intra (n)	Peri (n)	Wild (n)	Intra (n)	Peri (n)	Wild (n)
Taqó-Taqó	10	1	0	48	0	0	3	0
Julo Chico	25	7	24	46	12	0	106	0
Julo Grande	28	6	31	10	11	57	27	5
Calahuta	32	5	3	123	0	0	26	0

Abbreviation: Intra intradomestic, Peri peridomestic, n number of individuals

The susceptible reference lineage (SRL) CIPEIN came from Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) [38]. The baseline of susceptibility to deltamethrin of this lineage was determined by Gomez et al. [25] in Laboratory of Reference in Triatomines and Epidemiology of Chagas Disease, FIOCRUZ, Belo Horizonte.

Tests to determine insecticide susceptibility were conducted for each population, where a minimum of eight and a maximum thirteen doses by populations of active ingredient (a.i.), were applied ranging from 0.42 to 55 ng. For each insecticide dose, three replicates were performed with 10 instar F1 generation nymphs (five days, fasting, weight of 1.2 ± 0.2 mg). The topical application was through $0.2 \mu\text{l}$ of insecticide dilution in the dorsal abdomen, according to the procedures of the World Health Organization [39] and Pessoa et al. [40]. After treatment, mortality was assessed 72 h post-application and determined by the inability or lack of coordination of the nymphs to move from center to the edge of the filter paper (7 cm diameter). Signs of paralysis and lack of response to external stimuli were also considered. During and after the experiment, insects were kept under controlled conditions of temperature and relative humidity ($25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; $60\% \pm 10\% \text{ RH}$).

Diagnostic dose

The diagnostic doses (DD) applied was twice the minimum of the insecticide that causes 99% of mortality in the susceptible laboratory strain [20, 25, 41]. According to Gomez et al. [25] the LD99 to deltamethrin of the SRL was determined (5.50 ng a.i per insect) and the DD was estimated. According to Brown & Pal [42], mortality > 80% (DD) detects the presence of resistant individuals in a population. Values of $RR_{50} > 5$, according to the criteria established by PAHO [43], were considered as resistant to deltamethrin.

Data analysis

The dose data/mortality was analyzed using the program PoloPlus version 2.0 [44]. The lethal doses required to kill 50% of treated individuals (LD_{50}) was estimated and the resistance ratio (RR_{50}), with their respective confidence intervals (95% CI).

Results

In the four communities, 305 and 221 triatomines were captured before and after spraying, respectively. All captured triatomines were identified as *T. infestans*. Nineteen DUs were infested in the first phase and 11 in the second phase of the study (7 DUs were recurrent of the first phase). Two sylvatic foci were found, one in the communities of JC and another in JG; after eight months, only JG was positive in the second phase (Table 1).

Sixteen samples were obtained in the first capture, defined by the different domestic structures in the intra and peridomestic environments, and two in the sylvatic environments. All populations were resistant to deltamethrin (Table 2). The values of RR_{50} were 28.90 in the intradomicile to 54.7 for the peridomicile, and the wild population showed RR_{50} of 29.21–38.21. In the second capture of 13 populations of *T. infestans* from domestic and wild environments, all were resistant to deltamethrin (Table 3), with values RR_{50} of 21.91–40.67.

All populations evaluated before and after spraying showed mortality lower than 33% for the diagnostic dose (DD). Comparing before and after spraying at the microgeographical level, the toxic response was different for triatomines within the same DU in the different communities. Of the seven DU positives (before and after fumigation), four had similar values of (JC2, JG4a, JG6, CA5a) and in three DUs, lower resistance after spraying (JC3b, JG3, CA2) was observed (Tables 2 and 3).

Discussion

This study shows the high resistance to deltamethrin by domestic and wild *T. infestans* populations in four communities of the municipality of Toro Toro, Bolivia, before and eight months after spraying. Of particular importance are the results at the microgeographical level, demonstrating different resistance values in structures of the same DU. The calculation of RR_{50} is an important and frequent indicator of triatomine resistance to insecticides besides the diagnostic dose DD [17, 20, 25, 45], as it provides information about the mortality of a population in contact with different doses of insecticide, and can be employed to detect the presence of resistant individuals in a population [42]. How these indicators vary was evidenced in our

Table 2 Toxicological profile of *T. infestans* populations of domestic and sylvatic ecotopes, evaluated in the communities of Taqú, Taqú, Julo Chico, Julo Grande and Calahuta, Potosí, Bolivia, before spraying with alphacypermethrin 50 mg a.i./m² (January 2014)

CD	Ecotope (I, P, S)	Before spraying			
		LD ₅₀ (95% CI) (n)	Slope ± SE	RR ₅₀ (95% CI)	(n) DD%
OPEN (SRL)		0.47 (0.32–0.51) (210)	3.03 ± 0.37		
TQ 1	Goat corral (P)	12.78 (10.88–14.59) (216)	3.80 ± 0.44	31.37 (25.08–39.25)	(30) 14.8
JC 2	Kitchen wall (P)	12.33 (9.9–14.6) (270)	3.57 ± 0.32	30.26 (23.46–39.03)	(30) 23.3
JC 3(a)	Deposit (P)	11.43 (10.01–12.81) (270)	3.57 ± 0.39	28.06 (22.75–34.61)	(30) 13.3
JC 3(b)	Goat corral and chicken coop (P) ^a	22.29 (20.04–24.59) (300)	4.06 ± 0.40	54.70 (44.83–66.73)	(30) 0
JC 4	Goat corral (P)	12.41 (8.37–16.98) (240)	2.73 ± 0.32	30.47 (24.06–38.60)	(30) 23.3
JC 7	Chicken coop (P)	13.06 (10.734–15.26) (240)	2.74 ± 0.35	32.06 (25.15–40.87)	(30) 23.3
JC 5f	Rocky outcrop (S)	15.57 (14.09–17.07) (300)	4.54 ± 0.43	38.21 (31.42–46.47)	(30) 3.3
JG 1	Goat corral (P)	10.45 (9.11–11.84) (300)	3.09 ± 0.31	25.66 (20.69–31.81)	(30) 16.7
JG 3	Kitchen roof (P)	18.85 (16.79–20.84) (240)	4.02 ± 0.53	46.27 (37.85–56.57)	(30) 0
JG 4(a)	Bedroom (I)	14.72 (13.28–16.24) (300)	3.98 ± 0.38	36.12 (29.63–44.04)	(30) 0
JG 6	Bedroom (I)	11.77 (10.53–12.99) (240)	4.76 ± 0.49	28.90 (23.67–35.28)	(30) 6.6
JG 5f	Rock cliff (S)	11.90 (10.55–13.25) (270)	4.14 ± 0.41	29.21 (23.80–35.86)	(30) 6.6
CA 1	Living room wall (P)	13.27 (11.64–14.90) (290)	3.00 ± 0.27	32.57 (26.38–40.22)	(30) 6.6
CA 2	Living room wall (P)	22.28 (17.97–27.34) (270)	3.36 ± 0.38	54.67 (44.42–67.29)	(30) 0
CA 5(a)	Goat corral (P)	15.63 (13.99–17.23) (300)	4.36 ± 0.43	38.35 (31.41–46.82)	(30) 3.3
CA 5(b)	Dog house (P)	15.99 (14.64–17.39) (240)	5.53 ± 0.57	39.25 (32.43–47.50)	(30) 0

Abbreviations: CD code tritoxine population, SRL susceptible reference lineage, I intradomestic, P peridomestic, S sylvatic, n number of individuals used, LD₅₀ lethal dose that killed 50% of the population (ng.a.i./insect), CI confidence interval, RR₅₀ resistance ratio, DD % mortality at the diagnostic dose
^aMixed structure of goat corral and chicken coop

Table 3 Toxicological profile of *T. infestans* populations of domestic and sylvatic ecotopes, evaluated in the communities of Julo Chico, Julo Grande and Calahuta, Potosí, Bolivia, after spraying with alphacypermethrin 50 mg a.i./m² (October 2014)

CD	Ecotope (I, P, S)	After spraying			
		LD ₅₀ (95% CI) (n)	Slope ± SE	RR ₅₀ (95% CI)	(n) DD%
OPEN (SRL)		0.47 (0.32–0.51) (210)	3.03 ± 0.37		
JC 2	Kitchen wall (P)	12.11 (10.40–13.81) (270)	3.17 ± 0.34	29.72 (23.81–37.08)	(30) 6.7
JC 3(b)	Goat corral and chicken coop (P) ^a	14.72 (11.95–17.37) (240)	3.55 ± 0.42	36.13 (29.07–44.90)	(30) 13.3
JC 6	Goat corral (P)	11.10 (9.38–12.68) (270)	3.40 ± 0.39	27.26 (21.74–34.18)	(30) 10
JG 3	Kitchen roof (P)	10.47 (6.66–13.75) (180)	2.89 ± 0.44	25.70 (19.93–33.15)	(30) 30
JG 4(a)	Bedroom (I)	14.44 (10.72–17.94) (270)	2.51 ± 0.30	35.45 (27.66–45.43)	(30) 13.3
JG 4(b)	Tree with chickens (P)	12.71 (10.32–14.90) (270)	2.72 ± 0.32	31.19 (24.34–39.96)	(30) 13.3
JG 4(c)	Chicken coop (P)	10.22 (6.47–11.84) (180)	3.59 ± 0.48	25.10 (19.82–31.78)	(30) 16.7
JG 5	Bedroom wall (P)	11.03 (7.80–13.93) (210)	3.49 ± 0.43	27.08 (21.49–34.12)	(30) 23.3
JG 6	Bedroom (I)	11.34 (9.19–13.32) (210)	2.92 ± 0.40	27.84 (21.72–35.68)	(30) 13.3
JG 5f	Rock cliff (S)	16.57 (10.86–22.19) (270)	2.45 ± 0.32	40.67 (32.04–51.64)	(30) 20.0
CA 2	Living room wall (P)	11.34 (9.12–13.37) (210)	3.80 ± 0.39	27.83 (21.63–35.80)	(30) 23.3
CA 3	Goat corral (P)	8.92 (5.09–11.67) (180)	3.41 ± 0.54	21.91 (17.23–27.85)	(30) 33.3
CA 5(a)	Goat corral (P)	16.51 (12.55–19.97) (210)	5.88 ± 0.72	40.52 (33.41–49.15)	(30) 3.3

Abbreviations: CD code tritoxine population, SRL susceptible reference lineage, I intradomestic, P peridomestic, S sylvatic, n number of individuals used, LD₅₀ lethal dose that killed 50% of the population (ng.a.i./insect), CI confidence interval, RR₅₀ resistance ratio, DD % mortality of the diagnostic dose
^aMixed structure of goat corral and chicken coop

measurements in an artificial environment (a mixed structure used as goat corral and chicken coop) before and after spraying: housing 3(b) of Julo Chico had a RR_{50} of 54.7 and RR_{90} of 36.13, contrary to what was observed in environments intradomicile of the house 4(a) of Julo Grande (RR_{50} of 36.12 to RR_{90} of 35.45). The variation in the wild environment of Julo Chico (RR_{50} of 38.21) and Julo Grande (RR_{50} of 29.21 to RR_{90} of 40.67) was also variable.

There was also variation in the values observed inside the same house (house 3 of Julo Chico), among the insects captured in different ecotypes and in the same period: deposit with RR_{50} of 28.6 and goat corral and chicken coop with RR_{50} of 54.7.

These different resistance profiles in different DUs from the same communities show the different geographical structuring of the resistance phenotype among the communities and ecotypes within sites at the microgeographical level. Already among the wild populations these showed profiles of high insecticide resistance. Thus, the persistence of these residual foci is probably related to the low efficiency of the insecticide applied in these communities. According to what was observed in areas of the Gran Chaco, both environmental factors [22, 46, 47] and existing surface characteristics would have different effects on the applied insecticide, conditioning or limiting its insecticidal action. In this situation, the insects would be exposed to sublethal doses, selecting resistant insects [13, 48, 49].

On the other hand, studies of *T. infestans* wild populations indicate that diverse regions of Bolivia [25, 26, 49] present different resistance profiles to insecticides. Wild populations from the Inter-Andean Valleys (Andean region) and the Gran Chaco (non-Andean region) resulted in resistance to deltamethrin with values ranging between 6.8 and 11.9 [26, 48]. Fipronil resistance varies between 5.5–45.6 [26], although this insecticide has never been used to triatomine control. In parallel, in these regions other wild *T. infestans* populations were reported susceptible [25].

Our results of wild *T. infestans* population showed high rates of resistance, ranging between 29.21–40.67. According to our observations and information from local authorities, the sylvatic area studied has never presented anthropogenic changes (such as agriculture or pasture), due its topography with predominance of rocky hills. As described in other regions, it seems that this deltamethrin resistance could be autochthonous, and the origin of the resistant domiciliary insects. The other way, from the houses to the sylvatic environment, had never been described for *T. infestans*. Nonetheless, it must be investigated using molecular markers.

Conversely, the presence of different profiles of residual foci of *T. infestans* in Bolivia indicates the occurrence of independent evolutionary processes of resistance to insecticides in the different regions. The high genetic variability

described for *T. infestans* by Torres-Perez et al. [50] and Panzera et al. [51] justifies Bolivia as the center of origin and dispersion of the species, which could explain the reason why natural insecticides resistance have risen in this country [52].

Conclusions

The results of the present study demonstrated high resistance to deltamethrin of domestic and sylvatic *T. infestans* of Toro Toro, Potosí, Bolivia, varying at the macro- and microgeographical levels; this is more complex when considering the importance of many factors that act over the biological performance of a population, e. g. reproductive capacity, viable offspring, obtaining blood capacity, dispersion capacity, and others, that should be investigated.

Abbreviations

a.i.: active ingredient; RH: relative humidity

Acknowledgments

This study was supported by PEC-PIG Capes/Brazil through granting of a doctoral scholarship (13254-12-7) to JEE. We thank to the National Chagas Disease to Bolivia, Lic. Omar Tenorio Vasquez for assistance in the collection of *Triatominae* on the field and Dr Luis Eduardo Martínez Villegas for the correction of English; to Bayer S.A., Brazil for providing the insecticide Deltamethrin technical grade 99.116; to the CIPRA, for the susceptible reference lineage (SR).

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

All the authors have contributed substantially to this study. JEE, LGD, MBG and MRC conceived the study. JEE, MBG and ANR compiled the data. JEE and MBG analyzed the data. JEE, LGD, GCDP and MBG wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide of the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz. The protocol was approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz, Permit Number: 41/14-2). The weekly feeding on children (*Gallus gallus*) was performed using detomidine + ketamine anesthesia (intramuscular injection).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratório de Referência Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas Rene Rachou, FIOCRUZ-M G, Belo Horizonte, Brasil. ²CEADES Salud y Medio Ambiente/Plataforma Chagas, Cochabamba, Bolivia. ³Servicio Departamental de Salud - Potosí, Programa Nacional de Chagas, Potosí, Bolivia.

Received: 25 October 2016 Accepted: 22 January 2018

Published online: 17 February 2018

References

- Dias J, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (*Trypanosomiasis*) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:103–21.
- Waleckx E, Suarez J, Richards B, Corn PL. *Triatoma sanguinipes* blood meals and potential for Chagas disease, Louisiana, USA. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:2141–3.
- Leite H, Wygodzinsky P. Revision of the *Triatominae* (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;103:125–570.
- Romana C. *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: López Liberos; 1963.
- Guillen G, Diaz R, Jemio A, Casab JA, Pinto CT, Schofield CJ. Chagas disease vector control in Topiza, southern Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92:1–6.
- Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCCh). Anuario Programa Nacional de Chagas Bolivia. In: La Paz: Estado Plurinacional de Bolivia Ministerio de Salud y Deportes Dirección General de Servicios de Salud Unidad de Epidemiología Programa Nacional de Chagas; 2008.
- Hemington J, Ramon H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000;43:371–91.
- Schofield C. Field testing and evaluation of insecticides for indoor residual spraying against domestic vectors of Chagas disease. World Health Organization, Communicable Disease Control, Prevention and Eradication, WHO Pesticide Evaluation Scheme; 2001. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66182/1/WHO_CDS_WHCPEE_GCDPEP_2001.1.pdf. Accessed 20 Sept 2016.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:603–12.
- Zerba E. Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina*. 1999;59:41–6.
- Schofield CJ, Jansen J, Salaverra R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006;23:383–8.
- Dias JCP. Southern Cone initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transmission Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:11–6.
- Gürtler RE. Research Directly Linked With Current Vector Control Strategy. Working paper for the Scientific Working Group on Chagas Disease Research, convened by the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) and the Pan American Health Organization (PAHO); 2007. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.396.3086&rep=rep1&type=pdf>. Accessed 28 Sept 2016.
- Vasena C, Picollo M, Zerba E. Insecticide resistance in Brazilian *Triatominae* infestans and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol*. 2000;14:51–3.
- Santos Orhuéla FJ, Vasena CV, Zerba E, Picollo M. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2008;43:298–306.
- Pessoa GCD, Vinals FA, Rosa ACL, Diabulati L. History of insecticide resistance of *Triatominae* vectors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48:380–9.
- Piccolo M, Vasena C, Santos Orhuéla F, Santos S, Zedemberg M, Zerba E. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from northern Argentina. *J Med Entomol*. 2005;42:637–42.
- Tolosa AC, Germano M, Cueto GM, Vasena C, Zerba E, Picollo M. Differential pattern of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2008;43:421–6.
- Germano M, Acevedo GR, Cueto GM, Tolosa A, Vasena C, Picollo M. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *J Med Entomol*. 2010;47:1077–81.
- Lardeau F, Depickere S, Duchon S, Chavez T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Top Med Int Health*. 2010;15:1037–48.
- Guevitz JM, Gasque ML, Enriquez GF, Proveschio YM, Kibron U, Gürtler RE. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;7:e21158.
- Cocero MC, Gürtler RE, Canale D, Chut R, Cohen JE. The role of the penderamiclay area in the elimination of *Triatoma infestans* from rural Argentine communities. *Rev Patrim Salud Publ*. 1997;1:273–9.
- Cocero M, Gürtler R, Canale D, Chut R, Cohen JE. Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the infestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop*. 2002;84:101–10.
- Quisenberry S, Waleckx E, Monge M, Chang S, Nogueira F, Breniere SF. "Andean" and "non-Andean" *ITS-2* and *mtCyb* haplotypes of *Triatoma infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): population genetics and the origin of reinfestation. *Infect Genet Evol*. 2011;11:1006–14.
- Gomez MB, Pessoa G, Orellana ALG, Cortez MR, Rose ACL, Nogueira F. Susceptibility to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* of the Gran Chaco and the inter-Andean valleys of Bolivia. *Parasit Vectors*. 2014;7:497.
- Acevedo GR, Cueto GM, Germano M, O'Hualla PS, Cortez MR, Nogueira F, et al. Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *J Med Entomol*. 2011;48:828–35.
- Germano MD. Eficacia y efectos demográficos de la resistencia a deltamethrina en *Triatoma infestans*. 2012. http://digital.biblioteca.org/pdf-283/cg-bin/libray.cgi?ar=dlc-testid=Testn_5316_Germano. Accessed 28 Sept 2013.
- Antezana C, Navarro G. Contribución al análisis biogeográfico y catálogo preliminar de la fauna de los valles secos interandinos del centro de Bolivia. *Rev Bol de Ecol Bolivia*. 2002;12:3–38.
- Navarro G. Provincia Biogeográfica de la Puna Peruviana. In: Navarro G, Maldonado M, editors. *Geografía ecológica de Bolivia: vegetación y ambientes actuales*. Centro de Ecología Simón I. Patiño, Cochabamba: Departamento de Difusión; 2002. p. 243–431.
- Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCCh). Reporte técnico. In: Programa Nacional de Chagas, Departamento de Fitos, Bolivia; 2013.
- Silveira AC, Sanchez O. Guía para muestreo en actividades de vigilancia y control vectorial de la enfermedad de Chagas. 2003. http://www.paho.org/una/index.php?gpd=57&option=com_docman&task=doc_view. Accessed 13 Feb 2011.
- Programa Nacional de Control de Chagas-Escudo Epidemiológico, Ministerio de Salud y Deportes. Manual de Operaciones de Campo. In: Programa Nacional de Control de Chagas Ministerio de Salud y Deportes, La Paz-Bolivia; 2005. p. 33.
- World Health Organization. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. 6th ed, 2006. http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHCPEE_GCDPEP_2006.1_eng.pdf. Accessed 25 June 2015.
- Nogueira F. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. Chagas, la enfermedad en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998–2000). La Paz; 1999. p. 17–47.
- Nogueira F, Abad-Franich P, Valente SA, Diaz-Ulma A, Lopes CM, Cunha V, et al. Trapping *Triatominae* in sylvatic habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;97:81–3.
- Pessoa GC, Hiburquerque R, Alves RV, de Costa VM, Cavalante XR, Diabulati L. Fortalecimiento de vigilancia em saúde no Brasil: Rede de Monitoramento da Resistência dos triatomíneos aos inseticidas. *Rev Patrim Trop*. 2016;42:417–24.
- Amelotti I, Romero N, Catalá JJ, Gorla DE. Variability of the susceptibility to deltamethrin in *Triatoma infestans*: the female factor. *J Med Entomol*. 2011;48:1307–73.
- Piccolo M, Wood E, Zerba E, Licastro S, Roveda M. Método de laboratorio para medir la actividad de insecticidas en *Triatoma infestans*. *Acta Bioquím Clin Latinoam*. 1970;10:67–71.
- World Health Organization. Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre *Triatominae*. *Acta Toxicol Arg*. 1994;2:25–32.
- Pessoa GCD, Santos TRM, Salazar GC, Dias LS, Mello BV, Ferraz ML, Diabulati L. Variability of susceptibility to deltamethrin in penderamiclay *Triatoma sordida* from Triângulo Mineiro, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48:417–21.
- World Health Organization. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets, vol. 60, 2006. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66296/1/WHO_CDS_NTD_WHCPEE_GCDPEP_2006.1_eng.pdf. Accessed 2 June 2016.
- Brown JWR, Pal R. Resistance des arthropodes aux insecticides, 3rd ed. *Série de Monographies*. B. Geneva: Organisation Mondiale de la Santé; 1973. p. 341.

43. Organización Panamericana de la Salud. II Reunión técnica latinoamericana de monitoreo de resistencia a insecticidas en triatomínicos vectores de Chagas. OPS. Panamá: PAHO; 2005.
44. Software. I. R: RStudio: probit and logit analysis. In: LeDra Software; Berkeley, CA; 2002.
45. Depickère S, Buitrago B, Sifari E, Baune M, Morje M, Lopez R, Walecka E, et al. Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:1042–7.
46. Rojas de Arias A, Lehane M, Schofield C, Maldonado M. Pyrethroid insecticide evaluation on different house structures in a Chagas disease endemic area of the Paraguayan Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99:67–62.
47. Germano MD, Picollo MI, Mougabure-Cueto GA. Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta Trop*. 2013; 128:361–365.
48. Gürtler RE. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:32–9.
49. Cáceres MC, Vazquez-Proskop GM, Gürtler RE, Kitron U. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:803–10.
50. Torres-Perez F, Acuna-Retamar M, Cook TA, Bacigalupo A, Garcia A, Cattán PE. Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: testing biogeographic hypotheses of dispersal. *Infect Genet Evol*. 2011;11:167–74.
51. Parzena F, Ferrero ML, Pita S, Calleso L, Perez R, Batmangchi Y, et al. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infect Genet Evol*. 2014;27:103–13.
52. Diaz JF, Schofield C. Introducción. Triatomínicos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. In: Cortez AM, editor. *Triatomínicos de Bolivia y la enfermedad de Chagas: Triatoma infestans, principal vector de la enfermedad de Chagas en Bolivia*. Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia-Programa Nacional de Chagas; 2007. p. 13–7.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.3. Dinamica da infestação e variabilidade genética das populações de *T. infestans* nas quatro comunidades do município de Toro Toro

As quatro comunidades selecionadas para o estudo do processo de infestação e reinfestação foram avaliadas nas duas etapas: 1) pré borrifação (janeiro 2014), 2) após borrifação (Outubro de 2014). Nas duas etapas foi avaliado o mesmo número de ecotopos presentes casas (95 UDs), sendo as mesmas UDs em ambas as etapas (Anexo3).

5.3.1. Inquérito entomológico antes e após borrifação

Das 95 UDs existentes nas comunidades de Taqó Taqó (TQ), Julo Chico (JC), Julo Grande (JG) e Calahuta (CA), nas duas fases do estudo (pré e pós borrifação), obtiveram como resultado um total de 532 exemplares de *T. infestans*. Na primeira fase 19 UDs e na segunda fase 11 UDs resultaram positivos a presença de *T. infestans* (Tabela 5).

Populações de triatomíneos silvestres só foram capturadas nas Comunidades de JC e JG, com ajuda de 50 e 100 armadilhas respectivamente, dando como resultado um total de 23 indivíduos de *T. infestans* na primeira fase; na segunda fase só a comunidade de JG apresentou presença de triatomíneos silvestres, contabilizando um total de cinco indivíduos (Tabela 3).

Tabela 3. Número de Triatomíneos capturados nas comunidades de Taqó Taqó, Julo Chico, Julo Grande e Calahuta antes e após borrifação com alfacipermetrina 50 mg a.i./m².

Comunidades	AV	UDs	Ecótopos					UDs	Após borrifação				
			I-P-S	Ninfas (I-V)	Ad♀	Ad♂	Total		I-P-S	Ninfas (I-V)	Ad♀	Ad♂	Total
Taqó Taqó	10	1	P	42	1	5	48	1	P		1	2	3
Julo Chico	25	7	I	11	4	9	24	3	I				0
			P	39	4	3	46		P	85	12	9	106
Julo Grande	28	6	S	9	1	2	12	4	S	-	-		0
			I	24	5	2	31		I	49	5	3	57
			P	8	2		10		P	23	2	2	27
Calahuta	32	5	S	8	1	2	11	3	S	4	1		5
			I	3			3		I				0
			P	91	6	26	123		P	23	2	1	26
Total	95	19		235	24	49	308	11		184	23	17	224

UDs: Unidade domiciliar positiva a triatomíneos; Av: número de UDs avaliados; I: intradomicílio, P: peridomicílio, S: silvestre; Ninfas (I-V): de primeiro a quinto estágio; Ad: adultos; ♀(fêmeas); ♂ (machos).

Foi observada uma variação na abundância geral dos triatomíneos capturados nas UDs e no ambiente silvestre, antes e oito meses após a borrifação. Ao longo do estudo considerando todas as comunidades observou-se uma variação de 308 para 224 triatomíneos (Tabela5), mas a nível de comunidades estas não apresentaram diferenças (Fig 4).

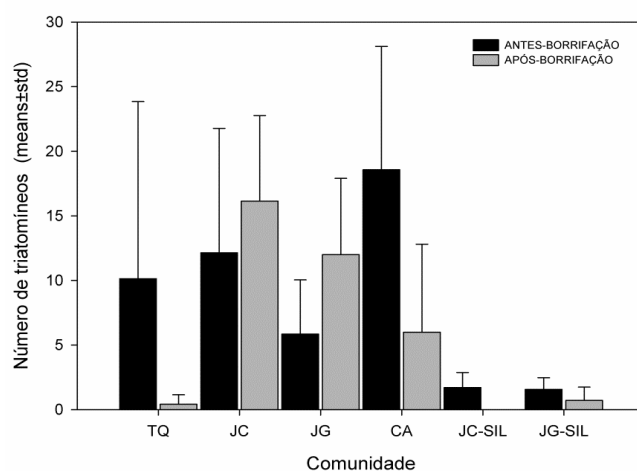


Figura 4. Número de *Triatoma infestans* capturados nos diferentes ambientes das comunidades de Toro Toro antes e após borrifação.

5.3.2. Índice de infestação (II), colonização (IC), para *Triatoma infestans* antes e após borrifação.

Dentre as quatro comunidades, JC apresentou um maior índice de infestação intradomiciliar (II) (28%), seguida por JG (21%). Comparados com a segunda fase, a comunidade de JG apresentou maior II (14%) e JC (12%). Estes valores observados refletem uma diminuição de UDs positivas como resultado das intervenções químicas. Porém este padrão não só foi observado para a infestação intradomiciliar, mas também no índice de colonização (tabela 4).

Tabela 4. Índice de infestação (II) e colonização (IC) para *T. infestans* nas UDs (Intra, peridomicílio) nas quatro comunidades do município de Toro Toro, antes e após borrifação com alfacipertrina 50 mg a.i./m².

Comunidades	II							IC					
	Av	Antes		Após				Antes			Após		
	% (n)	Intra % (n)	Peri % (n)	% (n)	Intra % (n)	Peri % (n)	% (n)	Intra % (n)	Peri % (n)	% (n)	Intra % (n)	Peri % (n)	
Taqó Taqó	10	10 (1)	0	10 (1)	10 (1)	0	10 (1)	10 (1)	0	100 (1)	0	0	0
Julo Chico	25	28 (7)	16 (4)	16 (4)	12 (3)	4 (1)	8 (2)	28 (7)	43 (3)	57 (4)	25 (3)	33 (1)	67 (2)
Julo Grande	28	21 (6)	18 (2)	7 (2)	14 (4)	11 (3)	7 (2)	21 (6)	67 (4)	33 (2)	28 (4)	75 (3)	50 (2)
Calahuta	32	16 (5)	3 (1)	13 (4)	6 (2)	0	9 (3)	16 (5)	40 (2)	100 (5)	32 (3)	0	100 (3)
Total	95	20 (19)	7.4(7)	11.6(11)	10.5(11)	4.2(4)	9.5(9)	20(19)	9.5(9)	12.6(12)	10.5(10)	4.2(4)	7.4(7)

Av: número de UDs avaliados; %: infestação geral das UDs; n: número de casas; II: Índice de infestação; IC: índice de colonização.

Tabela 5. Positividade das casas através das variáveis que apresentam maior efeito na infestação nas UD's pertencentes as quatro comunidades do município de Toro Toro, Potosí, Bolívia.

a:								
	PD.complex	pcgall	Anim.complex	distcasa	Tcabra	Pperro	pdormi	UD1
Importancia:	1	1	0,56	0,54	0,47	0,45	0,42	0,35
N containing models:	65536	65536	65536	65536	65536	65536	65536	65536
b:								
	pccabra	tperro	pdeposito	pmurop	tipo_intra	Cobveg	tipoperi	tgall
Importancia:	0,32	0,3	0,28	0,23	0,22	0,21	0,12	0,03
N containing models:	65536	65536	65536	65536	65536	65536	65536	65536
c:								
	Tipo.animal							
Importancia:	<0,01							
N containing models:	65536							

Número de estruturas PD (PD.complex), presença de galinheiro (pcgall), diversidade de animais domésticos (Anim.complex), distância a casa mais próxima (distcasa), presença de curral de cabra (tcabra), presença de cão (pperro) presença quarto (pdormi) infestação antes de fumigação (UD1), presença de curral de cabra (pccabra), tipo de abrigo cão (tperro), presença de depósito (pdeposito), presença de parede de pedra (pmurop), tipo de intra (tipo_intra), tipo de cobertura vegetal (cobveg), tipo de peridomicílio (tipoperi), tipo de galinheiro (tgall) e tipo animal doméstico presente (Tipo.animal).

Na tabela 5 mostra que as variáveis de maior peso na infestação das UD's são: número de estruturas no peridomestic (PD.complex), presença de galinheiro (pcgall) e diversidade de animais domésticos (Anim.complex), e distcasa com valores superiores a 5,4, por outra parte todas as demais variáveis têm menor peso a 0,5.

Tabela 6. Infestação intradomiciliar (A), peridomiciliar (B) antes (ID1) e após (ID2) a intervenção de controle e Infestação das UD's (C) por *T. infestans* no município de Toro Toro, Potosi, Bolivia.

A	ID2Pos	ID2Neg	Total	Reinfestation
ID1Pos	2	6	8	0,25
ID1Neg	0	89	89	0
B	PD2Pos	PD2Neg	Total	Reinfestation
PD1Pos	7	5	12	0,58
PD1Neg	3	82	85	0,04
C	UD2pos	UD2neg	Total	Reinfestation
UD1pos	10	9	19	0,53
UD1neg	1	0	1	1,00

Na tabela 6 no quadro A indica que 25% (=2/8) das casas foram reinfestadas na segunda fase da amostragem; já das 89 casas que resultaram negativas na primeira fase (ID1), as mesmas continuaram negativas na segunda fase (ID2). No quadro B, 58% dos peridomicilios positivos na primeira fase continuaram infestados na segunda amostragem. Já ao nível das UD's antes e após o controle químico observou-se 53% de reinfestação nas quatro comunidades avaliadas.

Tabela 7. Infestação intra e peridomiciliar (Inf) e abundância de *T. infestans* em casas antes e após intervenção de controle, segundo tipo de intra e peridomicílio, e tipo de cobertura vegetal.

Tipo de cobertura vegetal							
ID1	Agri	dveg	sinveg	ID2	agri	dveg	Sinveg
0	42	29	16	0	43	32	18
2	1	1	0	10	0	1	0
3	0	0	1	19	0	1	0
4	0	2	0				
5	0	1	0				
14	0	0	1				
18	0	1	0				
Inf	0,02	0,15	0,11		0,00	0,06	0,00
Abund	2	6,6	8,5			14,5	
ID infestation			0,084211				0,0211
PD1	Agri	dveg	sinveg	PD2	agri	dveg	Sinveg
0	40	30	13	0	40	29	16
1	0	1	0	3	0	0	1
2	0	1	0	5	1	0	0
3	0	0	1	8	0	1	0
9	0	1	1	10	1	0	0
10	1	0	0	11	1	0	0
18	0	1	0	20	0	1	0
20	0	0	1	22	0	1	0
21	1	0	0	27	0	1	0
24	0	0	1	35	0	1	0
48	0	0	1	49	0	0	1
68	1	0	0				
Inf	0,07	0,12	0,28		0,07	0,15	0,11
Abund	33	7,5	20,8		8,67	22,4	26
PD infestation			0,126316				0,1053
UD1	Agri	dveg	sinveg	UD2	agri	dveg	sinveg
0	40	29	13	0	40	29	16
1	0	1	0	3	0	0	1
2	1	2	0	5	1	0	0
3	0	0	2	8	0	1	0
4	0	2	0	10	1	1	0
5	0	1	0	11	1	0	0
9	0	1	1	19	0	1	0
10	1	0	0	20	0	1	0
14	0	0	1	22	0	1	0
18	0	2	0	27	0	1	0
20	0	0	1	35	0	1	0
21	1	0	0	49	0	0	1
24	0	0	1				
48	0	0	1				
68	1	0	0				
Inf	0,1	0,236842	0,35		0,0698	0,1944	0,1111
Abund	25,25	7	17,28571		8,6667	20,143	26
UD infestation			0,275862				0,1667

ID1, 2: intradomicílio antes e após borrifação, respectivamente; PD1, 2: peridomicílio antes e após borrifação; UD1, 2: Agri: cobertura do solo com as atividades agrícolas; dveg cobertura do solo com vegetação primária e sinveg: sim vegetação (solo nu).

Comparando o efeito do tipo de cobertura vegetal (tabela 7) sobre as características da infestação por *T. infestans* no intradomicílio “ID”, observa-se uma maior infestação antes da intervenção química (ID1) de 15% e abundância de triatomíneos em áreas dveg (cobertura do solo com vegetação primária) antes e após borrifação. Já para o peridomicílio “PD” a maior infestação ocorreu antes da borrifação em áreas sem vegetação (28%) e a maior abundância de triatomíneos na área com atividades agrícolas (agro). A nível de Unidades Domiciliares “UD” a maior infestação ocorreu antes da borrifação em áreas sem vegetação (35%) e uma maior abundância de triatomíneos foi observado após borrifação em áreas sem vegetação.

Tabela 8. Efeito do tipo de material utilizado na construção intra, peridomiciliar, sobre a infestação e abundância de *T. infestans* antes e após borrifação.

ID1	Ado	Ado_rev	Tij_rev	Pedr	ID2	Ado	Ado_rev	Tij_rev	Pedr
0	11	70	5	1	0	15	72	5	1
2	2	0	0	0	10	1	0	0	0
3	1	0	0	0	19	0	0	0	1
4	1	1	0	0					
5	0	0	0	1					
14	0	1	0	0					
18	1	0	0	0					
Inf	0,31	0,03	0,00	0,50		0,06	0,00	0,00	0,50
Abund	5,8	9		5		10			19

PD1	aasin	Ado	Ado_pedr	cer_esp	pedr	PD2	aasin	Ado	Ado_pedr	cer_esp	pedr
0	28	47	1	5	3	0	27	48	0	7	3
1	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	1
2	0	1	0	0	0	5	0	0	0	0	1
3	0	0	0	1	0	8	0	1	0	0	0
9	0	1	0	0	1	10	0	0	1	0	0
10	0	1	0	0	0	11	0	1	0	0	0
18	0	1	0	0	0	20	0	1	0	0	0
20	0	1	0	0	0	22	0	1	0	0	0
21	0	0	0	0	1	27	0	0	0	0	1
24	0	1	0	0	0	35	0	0	1	0	0
48	0	0	0	0	1	49	0	1	0	0	0
68	0	0	1	0	0						
Inf	0,00	0,11	0,50	0,29	0,50		0,00	0,09	1,00	0,00	0,50
Abund		13,83	68	2	26			22	22,5		11,7

Intradomicílio: ID; peridomicílio PD; antes 1; após borrifação 2; sem estrutura no peridomicílio: aasin; Adobe: Ado; Adobe com pedra: Adob_pedr; Adobe com revestimento: Adob_rev; Pedra: pdr; Cerca com espinhos: cer_esp; Tijolo com revestimento: Tij_rev.

Comparando o efeito do tipo de material de construção das estruturas domiciliares observou-se uma maior infestação antes e depois da intervenção química em estruturas de pedra com (50%). No PD a estruturas com maior infestação observa-se nas pedras (50%) e uma abundância maior em estruturas de Ado_pedr (PD1 = 68 e 22,5 PD2) (Fig 8).

5.4. Diversidade genética das populações de *Triatoma infestans*

5.4.1. Ao nível macrogeográfico entre as quatro comunidades.

Do total de indivíduos capturados (485) foram genotipados na primeira fase 284 indivíduos e 201 da segunda fase.

Foram identificados um total de 50 alelos para população de *T. infestans* da comunidade de TQ, 83(JC), 37(JC-Silv), 46(JG), 37(JG-Silv) e 93(CA). Oito meses após a primeira fase cinco populações de *T. infestans* foram analisadas, identificando um total de 19 alelos para a comunidade de TQ, 96(JC), 74(JG), 30(JG-Silv) e 65(CA). Os números dos alelos por locus variam de 2 a 20 nas quatro populações na primeira fase, e 2 a 19 na segunda fase. Já para as populações silvestres de *T. infestans* os alelos por locus variaram de 2 a 9 e de 2 a 4 na primeira fase e segunda fase, respectivamente (Tabela 9,10).

Na Tabela 9, as seis populações de *T. infestans* da primeira fase do estudo apresentaram uma heterozigocidade observada (H_o) que variou de 0,12500 para o primer Tinf ms_68, a 1,00000 para o primer Tinf ms_64. Por outra parte a heterozigocidade esperada (H_e) variou de 0,21169 para o primer Tinf ms_68 e 0,91091 para Tinf ms_65. Na segunda fase, cinco populações analisadas demonstraram uma heterozigocidade (H_o) que variou de 0,00000 para os primers Tinf ms_22 e de _56 a 1,00000 para o primer Tinf ms_64 (Tabela 10).

Para tabela 9 e 10 o test de equilibrio de Hardy-Weinberg indica que a heterocigocidade observada em as 11 populações existe um déficit de heterocigotos.

Tabela 9. Análises da diversidade genética baseada em nove locis microsatelites em seis populações de *Triatoma infestans* pertencentes as comunidades de TQ, JC, JG e CA (primeira fase).

Locus	TQ		JC		JC-silv		JG		JG-silv		CA							
	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He						
Tinf ms_3	8	0,51020*	0,66926	11	0,63793*	0,82534	6	0,63636	0,80087	6	0,70968*	0,72871	5	0,66667	0,69203	6	0,67816	0,67883
Tinf ms_5	5	0,53061	0,55691	11	0,42373*	0,64218	6	0,54545	0,75325	5	0,51613*	0,76943	5	0,41667*	0,73913	11	0,67816*	0,79543
Tinf ms_22	4	0,53061	0,55228	3	0,38983*	0,57062	3	0,45455	0,55844	3	0,38710	0,53094	2	0,33333	0,50725	7	0,61364	0,67818
Tinf ms_27	6	0,34043*	0,61450	7	0,44068*	0,65044	3	0,45455	0,59307	6	0,29032*	0,59334	3	0,33333	0,62681	7	0,64773*	0,61682
Tinf ms_42	6	0,57143*	0,74858	11	0,64407*	0,84630	3	0,36364	0,60606	4	0,51613*	0,59651	4	0,50000	0,64130	11	0,77273*	0,76584
Tinf ms_56	4	0,41667	0,48662	9	0,70690*	0,60180	3	0,63636	0,48052	5	0,48387	0,56584	3	0,58333	0,46739	18	0,50575*	0,75164
Tinf ms_64	4	0,73469*	0,50831	9	0,76271*	0,79371	3	0,81818*	0,54113	3	0,80645*	0,54151	4	1,00000*	0,63406	7	0,63218*	0,70700
Tinf ms_65	9	0,39583*	0,74057	17	0,64407*	0,91091	7	0,54545	0,85714	11	0,54839*	0,87573	9	0,41667*	0,80797	20	0,31395*	0,86434
Tinf ms_68	4	0,40816	0,42310	5	0,47458*	0,43865	3	0,45455	0,39394	3	0,29032	0,26177	2	0,25000	0,43116	6	0,12500*	0,21169

Número de alelos (A), heterozigidade observada (Ho), heterozigidade esperada (He); * p<0,05 equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 10. Análises da diversidade genética baseada em nove locis microsatelites em seis populações de *Triatoma infestans* pertencentes as comunidades de TQ, JC, JG e CA (segunda fase).

Locus	TQ		JC		JG		JG-Silv		CA						
	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He	A	Ho	He			
Tinf ms_3	3	0,66667	0,73333	14	0,64634*	0,89600	9	0,71569*	0,80585	3	0,40000*	0,64444	9	0,60465	0,72449
Tinf ms_5	1	-	-	16	0,58025*	0,85477	10	0,67327*	0,79272	4	1,00000*	0,71111	4	0,73810*	0,83649
Tinf ms_22	2	0,00000	0,53333	3	0,36585*	0,52903	3	0,43689*	0,55567	3	0,60000*	0,64444	4	0,55814*	0,61860
Tinf ms_27	2	0,66667	0,53333	8	0,30488*	0,52611	11	0,65049*	0,73469	5	0,60000*	0,82222	7	0,53488*	0,73434
Tinf ms_42	3	0,66667	0,73333	10	0,57317*	0,79276	6	0,59223*	0,54222	3	1,00000*	0,64444	8	0,65116	0,52421
Tinf ms_56	2	0,66667	0,53333	9	0,54430*	0,56954	7	0,71569*	0,54400	4	1,00000*	0,73333	8	0,64286	0,53557
Tinf ms_64	2	1,00000	0,60000	10	0,62963*	0,86619	9	0,56863*	0,63725	3	1,00000*	0,68889	5	0,72093	0,56115
Tinf ms_65	2	0,66667	0,53333	19	0,65432*	0,75516	14	0,35354*	0,82813	3	0,60000*	0,64444	16	0,40476*	0,86460
Tinf ms_68	2	0,66667	0,53333	7	0,39024	0,36982	5	0,09709*	0,12124	2	0,20000*	0,20000	4	0,23256	0,29302

Número de alelos (A), heterozigidade observada (Ho), heterozigidade esperada (He * p<0,05 equilíbrio de Hardy-Weinber

Os principais indicadores de variabilidade genética para cada população (primeira e segunda fase) analisada estão detalhados na tabela 11. O menor número médio de alelos (1,033) encontra-se na população de JG-Silv (primeira fase), enquanto a população TQ apresentou a maior média 9,222 (primeira fase), O valor mínimo (média) de heterozigosidade esperada foi calculado para a população TQ (0,5889) e valor maior foi para a população CA (0,8643). O teste estatístico G-W mostrou que as populações de *T. infestans* mostraram uma redução do número de alelos. Os valores de FIS mostraram que as populações JG-Silv e JC (primeira, segunda fase) e apresentaram maiores valores de endogamia.

Tabela 11. Diversidade genética intrapopulação de *Triatoma infestans* na primeira e segunda fase.

1ra fase						
População	N	A	Ho	He	G-W	FIS
TQ	49	9,222	0,483325	0,588903	0,33434	0.15377*
JC	59	4,111	0,56939	0,69777	0,26407	0.18262*
JC-Silv	11	4,111	0,54545	0,62049	0,45207	0.12621*
JG	31	1,0667	0,50538	0,60709	0,46482	0.16986*
JG-Silv	12	1,0333	0,5	0,61634	0,4409	0.19567*
CA	113	7,222	0,31395	0,86434	0,27397	0.17394*
2da fase						
TQ	3	5,556	0,625	0,59167	0,54004	-0,07143
JC	82	5,111	0,521	0,68437	0,19929	0.23414*
JG	103	8,222	0,53372	0,61798	0,33749	0.12434*
JG-Silv	5	2,111	0,71111	0,63704	0,39514	-0,13274
CA	19	3,333	0,56534	0,6325	0,35921	0.09811*

N: número de indivíduos; *: ($p < 0,05$); Número médio de alelos (A), heterozigozidade observada (Ho), heterozigozidade esperada (He) e índice de Garza-Williamson (G-W), índice de endogamia (FIS).

A matriz pareada dos valores FST para todas as populações da primeira e segunda fase mostraram resultados com valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para a grande maioria das populações. Os valores mais elevados de diferenciação genética foram observados entre as populações de JG-Silv e a população JC (Tabela 12).

Tabela 12. Matriz pareada com os valores de FST das populações de *T. infestans* (primeira e segunda fase)

	TQ	JC	JC-Silv	JG	JG-Silv	CA	TQ ⁺	JC ⁺	JG ⁺	JG-Silv ⁺	CA ⁺
TQ	0,00000										
JC	0,18945	0,00000									
JC-Silv	0,04452	0,09051	0,00000								
JG	0,09959	0,13563	0,04454	0,00000							
JG-Silv	0,18203	0,25889	0,11913	0,07958	0,00000						
CA	0,17879	0,24923	0,12438	0,09517	0,04059	0,00000					
TQ⁺	0,25727	0,23276	0,15061	0,09548	0,14141	0,14975	0,00000				
JC⁺	0,17317	0,24886	0,12038	0,06165	0,03435	0,04218	0,12207	0,00000			
JG⁺	0,22517	0,20332	0,14289	0,06194	0,11206	0,13084	0,04434	0,08647	0,00000		
JG-Silv⁺	0,23258	0,21285	0,14083	0,07451	0,11328	0,13770	0,05099	0,10484	0,03847	0,00000	
CA⁺	0,21626	0,21444	0,13113	0,07666	0,11619	0,10916	0,07117	0,08802	0,05640	0,04223	0,00000

⁺: comunidades pertencentes à segunda fase de avaliação.

5.4.2. Análise de variância molecular (AMOVA)

Toda a população foi dividida por comunidade (TQ, JC, JG, CA) e os resultados obtidos para nesste analises indicam que a maior variação entre indivíduos dentro as populações (82,18%) e que existe uma moderada variação entre populações (17,81%) (Tabela 13). Os índices estimados por AMOVA foram, para as comunidades de FST (0,1781), entre ambientes FST (0,042), entre ambienges dentro as comunidades de FST - 0,071e entre indivíduos dentro as populações de FST (0,178).

Tabela 13. AMOVA para os 9 locis analisados para as quatro comunidades (TQ, JC, JG, CA) de *Triatoma infestans*, no município de Toro Toro, Potosi, Bolivia.

Fonte de variação	d.f.	Soma de quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre comunidades	3	18,375	0,0504	17,819
Entre ambientes	2	1,128	0,0116	4,205
Entre ambientes dentro as comunidades	5	0,837	-0,0177	-6,286
Entre indivíduos dentro as populações	482	112,064	0,2329	82,180
Total	485	130,440	0.2829	100

5.5. O nível microgeográfico dentro as comunidades (ambiente doméstico e silvestre)

Ao nível microgeográfico dentro os diferentes ambientes presentes nas comunidades, o menor número médio de alelos (2) encontra-se na população de JC5_peri (primeira fase), enquanto a população CA5_peri mostrou a maior média de alelos 6,000 (primeira fase).

O valor mínimo (média) de heterozigosidade esperada foi calculado de 0,43341 para as populações de CA1_peri e o valor maior foi para a população JG5_peri (1), ambos pertencentes à primeira fase. As populações de JC4_peri e CA4_intra apresentaram maior valor de endogamia (FIS=1) na primeira fase; por outro lado, na segunda fase a população de CA2_peri foi a única que apresentou maior endogamia (FIS=0,93047).

O teste estatístico G-W mostrou que as populações de *T. infestans* apresentaram uma redução do número de alelos em todas as populações (nas duas fases) (Tabela 14).

Tabela 14. Análises da diversidade genética intraopulação dos ambientes domésticos (intra e peridomicílio) e silvestre dentro as quatro comunidades.

Name	N	A	He	Ho	G-W	FIS
TQ_A_peri	49	5,556	0,589	0,493	0,334	0,154
JC1_A_peri	3	2,889	0,659	0,519	0,529	0,253
*JC2_A_peri	5	4,444	0,706	0,667	0,290	0,063
JC3_A_peri	20	5,111	0,624	0,539	0,438	0,14
JC4_A_peri	5	3,333	0,667	0,600	0,465	0,111
JC6_A_peri	14	4,111	0,576	0,625	0,374	-0,096
JC7_A_peri	12	5,778	0,722	0,514	0,277	0,289*
JC_A_silv	11	4,111	0,620	0,545	0,452	0,126*
JG1_A_peri	9	3,222	0,585	0,519	0,500	0,119
JG2_A_peri	2	2,286	0,500	0,571	0,418	0,158
*JG3_A_peri	12	4,000	0,572	0,583	0,467	-0,021
JG4_A_intra	5	2,875	0,560	0,450	0,400	0,311
*JG6_A_intra	3	2,500	0,489	0,417	0,479	0,286
JG_A_silv	12	4,111	0,616	0,500	0,441	0,196
CA2_A_peri	12	4,333	0,609	0,528	0,427	0,138
CA3_A_peri	25	6,111	0,608	0,507	0,407	0,170
CA5_A_peri	45	7,667	0,688	0,598	0,312	0,115
CA5b_A_peri	6	2,750	0,458	0,500	0,516	0,032
*TQ_B_peri	3	2,250	0,526	0,625	0,540	-0,071

JC2_B_peri	35	6,333	0,602	0,465	0,352	0,226
*JC3_B_peri	26	5,444	0,571	0,541	0,298	0,048
JC8_B_peri	21	4,222	0,527	0,559	0,396	0,011
*JG3_B_peri	35	5,111	0,602	0,589	0,400	-0,086
JG4_B_intra	19	4,889	0,585	0,517	0,399	0,109
JG4B_B_peri	8	2,875	0,466	0,500	0,397	0,049
JG4C_B_peri	18	5,222	0,622	0,482	0,440	0,219*
JG5_B_peri	8	3,778	0,569	0,500	0,427	0,130
JG6_B_intra	15	5,000	0,648	0,620	0,355	0,027
*JG_B_silv	5	3,333	0,637	0,711	0,395	-0,133
CA1_B_peri	24	4,889	0,558	0,465	0,345	0,168*
*CA2_B_peri	9	3,778	0,624	0,731	0,387	-0,232
*CA3_B_peri	4	3,750	0,607	0,781	0,377	-0,172
*CA5_B_peri	6	3,500	0,569	0,708	0,393	-0,118

*populações presentes na primeira e segunda fase; A: número de indivíduos; N: número de indivíduos; *: ($p < 0,05$). Número médio de alelos, heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_e) e índice de Garza-Williamson (G-W), das seis e cinco populações

5.5.1. Análise de variância molecular (AMOVA)

Tendo em conta os resultados fornecidos pela estatística F e que as populações não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi realizada uma prova usando o programa Arlequin. Toda a população foi dividida por comunidade (TQ, JC, JG, CA). Os resultados obtidos para este estudo indicaram que a maior variação (48,22%) entre as subpopulações e que existe uma variação moderada entre indivíduos dentro as subpopulações (29,78%). Os índices estimados por AMOVA foram: FST (0,0420), FIS (0,61864), FSC (0,07035), FCT (0,48224) e FIT (0,81644) (Tabela 15).

Tabela 15. AMOVA para os 9 locis analisados das populações totais dos diferentes ambientes onde *Triatoma infestans* esteve presente, no município de Toro Toro, Potosi, Bolivia.

Fonte de variação	d.f.	Soma de quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre ambientes	2	2,257	0,0116	4,205
Entre indivíduos dentro os ambientes	483	128,182	0,2653	95,794
Total	485	130,440	0,2770	100

6. DISCUSSÃO

Dinâmica da infestação por *T. infestans*

Dentro as províncias altamente endêmicas para a doença de Chagas no Departamento de Potosi, o município de Toro Toro chama a atenção devido às condições extremas de pobreza que algumas de suas comunidades apresentam (USAID, 2011; INE, 2015), ideais para o estabelecimento e desenvolvimento de triatomíneos domésticos.

Neste contexto foram realizadas avaliações entomológicas em duas fases do estudo (antes e após borrifação). Na primeira avaliação a comunidade de JC mostrou maior porcentagem de infestação (28%); oito meses após a comunidade de JG foi a mais infestada (14%) (Tabela 5). Por outra parte, 58% da reinfestação intradomiciliar nas comunidades de TQ, JC, JG e CA foram atribuídos à presença de peridomicílios positivos observados antes de borrifação. Além disso, 53% da reinfestação das casas poderia ser resultado de uma baixa efetividade do inseticida (42%) (Tabela 8), prejudicando o êxito do programa do controle, e colaborando para a seleção de triatomíneos resistentes.

O estabelecimento dos triatomíneos é atribuído ao tipo de material utilizado na elaboração das casas, à ampla disponibilidade de refúgios e a disponibilidade de fontes de alimentação (Lorenzo & Lazzari, 1999; Abad-Franch *et al*, 2011; Dumonteil *et al*, 2013). Na nossa área de estudo a maior abundância de triatomíneos estava associada ao maior número de estruturas presentes no peridomicílio (PD, Complex), presença de galinheiros (pcgall), diversidade de animais domésticos (Anim,complex) e distancias entre as casas (distcasa), evidenciando-se a dificuldade para o controle do vetor.

Estudos realizados na Amazônia por Abad-Franch *et al*, 2010 sugerem uma possível relação entre a fertilidade do solo com a densidade de insetos. Contrariamente, nas comunidades avaliadas que pertencem aos Vales Interandino observou-se uma maior abundância de triatomíneos em áreas sem vegetação (sinveg), seguida de áreas com vegetação primária (dveg), o que, seguramente, está relacionado com a ecologia das espécies locais.

Segundo estudos realizados por Cécere et al, 1998; Gurevitz et al, 2011; Dumonteil et al, 2013; Gorla et al, 2013, tanto o material como o tipo de construção dos peridomicílios (currais, galinheiros e outras estruturas) apresentam um efeito na infestação e na abundância dos triatomíneos pois estas estruturas criam abrigos e condições estáveis para seu desenvolvimento. Este fato foi conferido em nosso estudo onde se evidenciou uma maior infestação em estruturas intradomiciliares construídas com pedra (50%), e com adobe (31%); já nas estruturas do peridomicílio a maior infestação se observou em estruturas construídas com adobe e pedra (100%), com pedra (50%).

A presença destas estruturas é um obstáculo para uma intervenção bem-sucedida, devido a que estas albergam populações residuais que sobreviveram ao tratamento inseticida (Vazquez-Prokopec et al, 2005; Cecere et al, 2006; Gurevitz et al, 2013). Outra razão da baixa eficácia do inseticida é devida a presença de populações de *T. infestans* resistentes em diversas áreas da Bolívia (Picollo et al 2005; Gomez et al, 2014; Bustamante et al, 2016) e à alta variabilidade das populações de *T. infestans* (Gorla et al, 2002; Bargues et al, 2006; Panzera et al, 2014; Bustamante et al, 2016).

Deve-se notar que restrições ambientais e socioculturais não incluídas em nosso estudo também poderiam modificar a dinâmica da infestação e reinfestação, assim como a abundância de *T. infestans* nestas quatro comunidades. Também deverá influir o constante fluxo que realizam os habitantes entre as comunidades, aspectos que deverão ser analisados posteriormente.

Diversidade genética dentro as populações de *Triatoma infestans* presente nas quatro comunidades do município de Toro Toro.

A estrutura genética é determinada, em primeira instância, pela distribuição das populações no espaço e a distância entre eles, a presença de barreiras antropogênicas, como estradas e áreas urbanizadas e / ou barreiras naturais; como por exemplo, condições climáticas, cobertura vegetal, montanhas e rios entre outros (Guillot et al, 2009).

Ao nível genético, alteração numa população poden ser descritas como a mudança na frequência dos diferentes alelos e as frequências dos genótipos e os processos que fazem a mudença na frequência de uma geração a outra são: a mutação, a deriva gênica, migração e a seleção natural (Guillot et al, 2009).

Nos últimos tempos têm sido utilizados inúmeros indicadores de variabilidade populacional em triatomíneos (Dujardin and Tibayrenc, 1985; Monteiro et al, 1999; Borgues et al, 2000; Bargues et al, 2006; Piccinali et al, 2009, 2011; Quisberth et al, 2011; Panzera et al, 2014). Esses indicadores fornecem uma grande quantidade de informações importantes para os estudos de biossistemática, genética populacional e evolução dos triatomíneos.

Estudos recentes na análise de genética populacional de triatomíneos baseam-se em marcadores moleculares altamente polimórficos (García et al, 2004, 2013; Marcet et al, 2006; Richer et al, 2007; Pérez de Rosas et al, 2008, 2013), tentando responder o por que do restabelecimento das populações de triatomíneos após a aplicação de inseticida, definindo o que é atribuído à persistência de focos de insetos residuais ou à migração destes.

Das comunidades de Taqo taqo, Julio Chico, Julio Grande y Calauta, un total de 485 triatomíneos foram genotipados para 9 locis de microsatélites polimórficos. Onde observou-se que o número médio de alelos por locus detectado por população variou de 2 a 20 nas quatro populações na primeira fase, e 2 a 19 na segunda fase. Já para as populações silvestres de *T. infestans* os alelos por locus variaram de 2 a 9 e de 2 a 4 na primeira fase e segunda fase, respectivamente (Tabla 11), diferindo dos valores (2-17) obtidos por Marcet et al, (2006) e (6-31) por Marcet et al, (2008) em triatomíneos procedentes de distintas províncias de Argentina.

A heterozigozidade esperada (H_e) em quase todas as populações foi maior que a observada (H_o). Segundo Pizarro et al, (2008), Pérez de Rosa et al, (2008), este excesso de homozigotos sugere a subdivisão da população por endogamia, padrão frequentemente relatado para *T. infestans*. A H_e mostrou baixos valores para Tinfest_ms68 e mais altos foram para Tinfest_ms65, contrario ao observada por Marcet et al, (2006) onde o lócu com maior valor observou-se em Tinfest_ms5 e o baixo valor para Tinfest_ms68.

O valor de FIS obtido na análise mostrou que existe uma alta redução de variabilidade genética da primeira para a segunda fase (após borrifação) (Tabela 11), demonstrando o efeito que poderia estar jogando o uso de inseticida sobre as populações avaliadas, fato corroborado pelos valores do índice G-W, que demonstrou valores baixos após borrifação (tabela 11).

Comparando os FST globais, observou-se uma diferença grande ao nível macrogeográfico entre as comunidades (FST=0.1781) e ao nível microgeográfico existe uma pequena diferenciação genética (FST=0,042). Estes valores observados sugerem as populações são dinâmicas, elas podem crescer em número, expandir sua área de ocorrência, ou diminuir. E que a maioria da diversidade genética de *T. infestans* se encontra dentro as subpopulações representadas pelos insetos presentes nas diferentes estruturas (Tabela 13, 15).

E que as populações de *T. infestans* em comunidades geograficamente próximas apresentam fluxo restrito entre elas, mesmo entre os mais próximos, chegando a estabelecer um isolamento por distância. De acordo com Guillot et al, 2009, estes efeitos podem ser devidos à presença de barreiras ou às características da paisagem que impedem o fluxo de genes. Por outro lado, ao nível microgeográfico, as subpopulações geograficamente próximas a pesar de estas estar próximas estas apresentam fluxo baixo entre elas. O que poderia indicar que existe uma estrutura espacial (Guillot et al, 2009).

Estes dados obtidos ao nível macro e microgeográfico sugerem que a combinação de dispersão ativa e passiva pode ter efeitos na estruturação populacional *T. infestans*, sendo possível que estas populações tenham se dispersado no município de Toro Toro através de uma expansão a escala macro (comunidades) e microgeográfica (ambientes domésticos), alcançando progressivamente todas as áreas em que foi encontrado atualmente. Estes processos teriam consequências importantes ao longo do tempo, podendo conduzir a alterações na estrutura genética da população.

Segundo Schofield (1988) *T. infestans* apresenta uma dispersão restrita a curtas distâncias e geralmente permanece na mesma casa ou em sua vizinhança imediata durante sua vida. Porém, além disso, a importância dos processos de migração humana é reconhecida para a ampla dispersão

conseguida pelo *T. infestans* (Silva, 1986; Gorla, 2002), o que, seguramente, tem papel significativo na estruturação da população da espécie nas diferentes regiões.

Os dados apresentados neste estudo são relevantes, principalmente, para os programas de controle vetorial da doença de Chagas de Bolívia. A persistência da infestação domiciliar por *T. infestans* obriga a manutenção das atividades de vigilância e controle do vetor, bem como a identificação das causas da persistência desta infestação. Os resultados relatados neste estudo indicam um método para estratificar espacialmente o risco de transmissão da doença de Chagas sobre as comunidades de Toro Toro, e dessa maneira orientar a distribuição diferenciada de recursos pela agência de saúde pública de Potosi.

Por outra parte devemos considerar que as áreas contínuas infestadas por *T. infestans* poderiam albergar populações com diferentes perfis de susceptibilidade e resistência, coexistindo em simpatria. A resistência observada nas populações doméstica e silvestre pode ser adquirida por pressão de seleção ou uma resistência natural. Qual ou quais são os mecanismos de resistência que estas populações domésticas e silvestres apresentam nas quatro comunidades? Neste caso, estudos moleculares e bioquímicos devem ser realizados para caracterizar as enzimas detoxificativas envolvidas no processo da resistência, assim como a identificação da mutação do sítio alvo.

O encontro de populações estruturadas nas quatro comunidades deve ser um indicador entomológico importante, que colabore para definição de novos focos, ou de reinfestação após intervenção com inseticida, orientando as ações de controle.

7. CONCLUSÃO

- Este estudo mostra que populações de *T. infestans* mantêm baixa infestação domiciliar em Toto Toro, mas que representa um risco potencial para a transmissão de *T. cruzi* nessas comunidades.
- Foi possível estratificar esta infestação domiciliar através de variáveis ambientais como temperatura (Bio2, Bio4 e Bio6), precipitação (Bio19) e produzir um mapa de risco para orientar as atividades de intervenções de controle de vetores no município de Toro Toro (Potosi, Bolívia).
- As populações domésticas e silvestres de *T. infestans* das quatro comunidades do município de Toro Toro, apresentam diferentes perfis de resistência ao inseticida deltametrina. A complexidade deste fenômeno não se limita apenas ao nível das comunidades, mas também ao nível microgeográfico (unidades domiciliares), o que deve ser considerado no momento de planejar atividades do programa de controle.
- A caracterização da estrutura genética de populações de *T. infestans* pode auxiliar aos programas de controle, através do desenvolvimento de estratégias de intervenção eficazes.
- As análises de genética populacional através de microssatélites, ao nível macrogeográfico, sugerem que as populações de *T. infestans* nas quatro comunidades estão altamente estruturadas geograficamente, com pouco ou moderado fluxo de genes entre elas. Por outro lado, ao nível microgeográfico, comparando o peridomicílio e o intradomicílio, os dados sugerem um fluxo de genes entre estes ambientes, limitando o êxito do controle nestas áreas.
- A avaliação do impacto do inseticida sobre a diversidade genética nas populações de *T. infestans* antes e após a borrifação, mostrou uma redução intrapopulacional do número de alelos. Por outro lado, estes resultados sugerem que os focos de infestação são populações residuais, o que condicionaria o êxito do programa de controle nestas comunidades.

8. REFERÊNCIAS

1. Acevedo GR, Cueto GM, Germano M, Santo Orihuela P, Cortez MR, Noireau F, Picollo MI, Vassena C: Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *Journal of medical entomology* 2011, 48(4):828-835.
2. Abad-Franch F, Vega MC, Rolón MS, Santos WS, de Arias AR. Community participation in Chagas disease vector surveillance: systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1207.
3. Abad-Franch, Fernando, et al. "Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales." *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(3): e620.
4. Antezana C, Navarro G: Contribución al análisis biogeográfico y catálogo preliminar de la flora de los valles secos interandinos del centro de Bolivia. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental* 2002, 12:3-38.
5. Arata A, Balderrama F, Bermudez H, Navin T, Ormsby G, Torrico F, Velarde R: Chagas en Bolivia Trabajo de la SNS CCH/programa piloto de control de Chagas. *La Paz, Bolivia, Ministerio del Desarrollo Humano, Secretaria Nacional de Salud* 1994.
6. Austin M: Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modelling. *Ecological modelling* 2002, 157(2):101-118.
7. Bargues, M. D., et al. "Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size." *Infection, Genetics and Evolution.* 2006; 6(1): 46-62.
8. Bermudez H, Balderrama F, Torrico F: Identification and characterization of wild foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 1993, 49:371.
9. Borges AC, Romanha AJ, Diotaiuti L: Uso do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in the populational study. *Cad Saúde Pública* 2000, 16(Supl. 2):97-100.

10. Bustamante GM, Diotaiuti LG, and Gorla DE. "Distribution of pyrethroid resistant populations of *Triatoma infestans* in the Southern Cone of South America." *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(3); e0004561.
11. Brenière SF, et al. "Wild populations of *Triatoma infestans* are highly connected to intra-peridomestic conspecific populations in the Bolivian Andes." *PLoS One* . 2013; 8(11): e80786.
12. Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis*. 1984;605-613.
13. Carcavallo RU: Climatic factors related to Chagas disease transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94:367-369.
14. Ceballos L, Piccinali R, Berkunsky I, Kitron U, Gürtler R: First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *J med entomol*. 2009; 46(5):1195-1202.
15. Ceballos LA, Piccinali RV, Marcet PL, Vazquez-Prokopec GM, Cardinal MV, Schachter-Broide J, Dujardin J-P, Dotson EM, Kitron U, Gürtler RE: Hidden sylvatic foci of the main vector of Chagas disease *Triatoma infestans*: threats to the vector elimination campaign. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(10):e1365.
16. Cécere M, Gürtler R, Chuit R, Cohen J: Factors limiting the domestic density of *Triatoma infestans* in north-west Argentina: a longitudinal study. *Bull WHO*. 1998; 76(4):373.
17. Cécere MC, Castañera MB, Canale DM, Chuit R, Gürtler RE: *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans* and other triatomines: long-term effects of a control program in rural northwestern Argentina. *Rev Panam Salud Públ*. 1999; 5(6):392-399.
18. Cécere MC, Vázquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Zárate JE, Zaidenberg M, Kitron U, Gurtler RE: Comparative trial of effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of *Triatoma infestans* in northwestern Argentina. *J med entomol*. 2006; 43(5):902.
19. Cécere MC, Vazquez-Prokopec GM, Gürtler RE, Kitron U: Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2004, 71(6):803-810.

20. Chagas Carlos. Nova tripanozomíase humana. “Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909; 1: 159-218.
21. Chippaux J-P, Postigo JR, Santalla JA, Schneider D, Brutus L: Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008; 102(6):578-584.
22. Chungara M: La enfermedad de Chagas 164-174.
23. Cortez MR, Emperaire L, Piccinali RV, Gürtler RE, Torrico F, Jansen AM, Noireau F: Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta Trop*. 2007; 102(1):47-54.
24. Coura JR: Tripanosomose, doença de Chagas. *Ciência e Cultura* 2003, 55(1):30-33.
25. Perez de Rosas ARP, Segura EL, Fusco O, Guiñazú ALB, García BA: Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas’ disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Genet*. 2013; 141(1-3):107-117.
26. Depickère S, Buitrago R, Siñani E, Baune M, Monje M, Lopez R, Waleckx E, Chavez T, Brenière SF: Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(8):1042-1047.
27. Dias JCP, Schofield CJ: Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31(4):373-383.
28. Dias JP, Schofield CJ: Introducción. Triatomíneos de Bolivia y la enfermedad de Chagas In: Triatomíneos de Bolivia y la enfermedad de Chagas “*Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Bolivia”. Edited by Cortez MR, Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia- Programa Nacional de Chagas edn: 2007. p. 15-17.
29. Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ: The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5):603-612.

30. Dumonteil, Eric, et al. "Eco-bio-social determinants for house infestation by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* in the Yucatan Peninsula, Mexico." *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(9): e2466.
31. Dujardin JP, Tibayrenc M. Etude de 11 enzymes et donnees de genetique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Soc Belg Med Trop*.1985; 65(3):271–280.
32. Excoffier, Laurent, Guillaume Laval, and Stefan Schneider. "Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis." *Evolutionary bioinformatics*.2005;1:47-50.
33. Excoffier, Laurent, and Heidi EL Lischer. "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." *Mol Ecol Resour*. 2010, 10(3): 564-567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847
34. Figueroa J: La enfermedad de Chagas en Tarija. 1986:3-34.
35. Forattini OP: Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Públ* 1980, 14(3):265-299.
36. Franklin J: Predictive vegetation mapping: geographic modelling of biospatial patterns in relation to environmental gradients. *Prog Phys Geogr*. 1995, 19(4):474-499.
37. Fox I, Bayona IG, Orozco HI. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *Bull WHO*. 1966; 35: 974-976.
38. Garcia B, Manfredi C, Fichera L, Segura E: Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68:692-694.
39. Garcia BA, Zheng L, ROSAS AR, Segura EL: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mol Ecol Notes*. 2004; 4(4):568-571.
40. Germano M, Acevedo GR, Cueto GM, Toloza A, Vassena C, Picollo M: New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *J Med entomol*. 2010; 47(6):1077-1081.

41. Germano M, Santo-Orihuela P, Roca-Acevedo G, Toloza A, Vassena C, Picollo M, Mougabure-Cueto G: Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. *J Med entomol.* 2012; 49(6):1355-1360.
42. Gomez MB, Pessoa G, Orellana ALG, Cortez MR, Rosa ACL, Noireau F: Susceptibility to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* of the Gran Chaco and the Inter-Andean Valleys of Bolivia. *Parasit Vectors.* 2014; 7:497.
43. Gorla DE, Catalá SS, Grilli MP: Efecto de la temperatura sobre la distribución de *Triatoma infestans* y el riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Argentina. *Acta toxicol argent.* 1997; 5(1):36-39.
44. Gorla DE, Noireau F: Geographic Distribution of Triatominae Vectors in America: *An Elsevier Title*; 2010.
45. Gorla DE, Schofield C: Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. *Med Vet Entomol.* 1989; 3(2):179-194.
46. Gorla DE: Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecol austral.* 2002; 12(2):117-127.
47. Gorla D. Perspectivas biológicas y ecológicas para el desarrollo de resistencia en triatominos. *Acta Toxicol Argent.* 1994; 2: 48-51.
48. Gorla, David Eladio, et al. "New structures for goat corrals to control peridomestic populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Gran Chaco of Argentina." *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(3): 352-358.
49. Guillén G, Diaz R, Jemio A, Cassab JA, Pinto CT, Schofield C: Chagas disease vector control in Tupiza, Southern Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92:1-8.
50. Guillot, Gilles, et al. "Statistical methods in spatial genetics." *Mol Ecol.* 2009;18(23): 4734-4756.
51. Guillen G, Alfred Cassab J, Villena E. Programa de control integral de la enfermedad de Chagas en Tupiza una experiencia al servicio del país. Conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998-2002). La Paz Bolivia: *Ediciones gráficas*; 1999.

52. Gonzalez Valdivieso FE, Sanchez Diaz B, Nocerino F. Susceptibility of *Rhodnius prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela. *WHO/VBC/71.264*; 1971.
53. Guisan A, Lehmann A, Ferrier S, Austin M, OVERTON J, Aspinall R, Hastie T: Making better biogeographical predictions of species' distributions. *J Appl Ecol.* 2006; 43(3):386-392.
54. Guisan A, Thuiller W: Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol lett.* 2005; 8(9):993-1009.
55. Guisan A, Zimmermann NE: Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol modell.* 2000; 135(2):147-186.
56. Gurevitz JM, Gaspe MS, Enriquez GF, Provecho YM, Kitron U, Gürtler RE: Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(4):e2158.
57. Gürtler RE: Research Directly Linked With Current Vector Control Strategy. 2007.
58. Hartl, Daniel L, Andrew G. Clark, and Andrew G. Clark. *Principles of population genetics*. Sunderland: Sinauer associates. Vol. 116.1997.
59. Instituto Nacional de estadística: Censo de Población y vivienda. In.; 2015.
60. Jarne P, Lagoda PJ: Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol.* 1996; 11(10):424-429.
61. Jauregui L, Valdivia C: Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Bolivia. *Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, Buenos Aires.* 1972;171-177.
62. Juarez, M. Patricia. "The effect of sublethal doses of insecticides on *Triatoma infestans* lipid synthesis." *Pestic Biochem Physiol.*1995; 52(2): 81-89.
63. Lardeux F, Depickère S, Duchon S, Chavez T: Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Trop Med Int Health.* 2010; 15(9):1037-1048.

64. Lent H, Wygodzinsky P: Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Revisión de los triatominae (Hemiptera, Reduviidae) y su significado como vectores del mal de Chagas. *Bull Am Mus Nat Hist.* 1979; 163(3):123-520.
65. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E: Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol.* 2002; 11(12):2453-2465.
66. López RP: Diversidad florística y endemismo de los valles secos Bolivianos. *Ecología en Bolivia.* 2003; 38(1):27-60.
67. Lorenzo MG, Lazzari CR: Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Trop.* 1999; 72(3):241-249.
68. Marcet P, Lehmann T, Groner G, Gürtler R, Kitron U, Dotson E: Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol.* 2006; 6(1):32-37.
69. Marcet P, Mora M, Cutrera A, Jones L, Gürtler R, Kitron U, Dotson E: Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of Santiago del Estero, northern Argentina. *Infect Genet Evol.* 2008; 8(6):835-846.
70. Mateo RG, Felicísimo AM, Muñoz J. Species distributions models: A synthetic revision. *Rev Chil Hist Nat.* 2011; 1;84(2):217-40.
71. Ministerio de Salud y Prevención Social, Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas (MPSSP/PNCCH): Estrategia de información, educación y comunicación del programa de Nacional de Chagas. In.; 2003.
72. Moncayo Á, 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; 104:17-30.
73. Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin J-P, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C, Beard CB: Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94:229-238.

74. Morgante M, Hanafey M, Powell W: Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet.* 2002; 30(2):194-200.
75. Mougabure-Cueto G, Picollo MI: Insecticide resistance in vector Chagas Disease: evolution, mechanisms and management. *Acta Trop.* 2015; 149:70-85.
76. Navarro G, Ferreira W: Zonas de vegetación potencial de Bolivia: Una base para el análisis de vacíos de conservación. *Rev. Bol. de Ecol.* 2004, 15:1-40.
77. Noireau F, Cortez MGR, Monteiro FA, Jansen AM, Torrico F: Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol.* 2005; 21(1):7-10.
78. Noireau F, Diosque P, Jansen AM: *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res.* 2009, 40(2).
79. Noireau F: La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. *Chagas: la enfermedad en Bolivia Ministerio de Salud y Previsión Social, La Paz.* 1999:17-47.
80. Nelson MJ, Colmenares P. Insecticide susceptibility of vectors of Chagas' disease in Venezuela. *WHO/VBC/79.736*; 1979.
81. Organización Mundial de la Salud (OMS): Enfermedad de Chagas serie de informes tecnicos In.: Organización Mundial de la Salud 1960.
82. Organización Mundial de la Salud (OMS): Serie de Informes."Control de la Enfermedad de Chagas". *Segundo informe del Comité de Expertos de la OMS Ginebra.* 2002:38.
83. Organización Panamericana de Salud (OPS): XVIIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Subregional Cono Sur de Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Transmisión Transfusional de la Tripanosomiasis Americana, Cochabamba, Bolivia, julio de 2008. In., 2011 edn; 2011: 49.
84. Organización Panamericana de la Salud (OPS): II Reunion técnica latinoamericana de monitoreo de resistência a insecticidas em triatomínos vectores de Chagas, OPS. Panamá: In.; 2005.

85. Panzera F, et al. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infect Genet Evol.* 2014; 27:105-113.
86. Perez de Rosas AR, Segura EL, Garcia BA: Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol ecol.* 2007; 16(7):1401-1412.
87. Perez de Rosas AR, et al. "Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina." *Genet.* 2008; 133(3): 247.
88. Pérez de Rosas AR, Segura EL, Fusco O, Guiñazú AL, García BA. Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Genet.* 2013; 141(1–3):107–117.
89. Perry AS, Yamamoto Y, Ishaaya I, Perry RY. Insecticides in agriculture and environment: *Retrospects and prospects*. Springer & Business Media. India; 1998. p 251.
90. Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E: High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol.* 2005; 42(4):637-642.
91. Pizarro JC, Gilligan LM, Stevens L: Microsatellites reveal a high population structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(3):1-8. e202.
92. Piccinali RV, Gürtler RE (2015) Fine-scale genetic structure of *Triatoma infestans* in the Argentine Chaco. *Infect Genet Evol.* 2015; 34:143–152
93. Piccinali RV, Marcet PL, Ceballos LA, Kitron U, Gürtler RE, Dotson EM (2011) Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flow in *Triatoma infestans* dark morphs from the Argentinean Chaco. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(5):895–903

94. Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCH): Anuario Programa Nacional de Chagas Bolivia. In. La Paz: Estado Plurinacional de Bolivia Ministerio de Salud y Deportes Dirección General de Servicios de Salud Unidad de Epidemiología Programa Nacional de Chagas; 2008: p 36.
95. Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCH): Relatorio técnico. In.: Programa Nacional de Chagas, Departamento de Potosi, Bolivia; 2013.
96. Pessoa et al. Susceptibility characterization of residual Brazilian populations of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin pyrethroid. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(2):1-5.
97. Pritchard JK; Stephens M; Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000; 155: 945-959
98. Quisberth S, Waleckx E, Monje M, Chang B, Noireau F, Brenière SF: “Andean” and “non-Andean” ITS-2 and mtCytB haplotypes of *Triatoma infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): population genetics and the origin of reinfestation. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(5):1006-1014.
99. Ramsey J, Ordoñez R, Cruz -Celis A, Alvear A, Chavez V, Lopez R, Pintor J, Gama F, Carrillo S: Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Medical and veterinary entomology* 2000, 14(1):19-30.
100. Rassi A, Marin-Neto JA: Chagas disease. *The Lancet* 2010, 375(9723):1388-1402.
101. Recacoechea M, De Muynck A, Zuna H, Rivero A, Romero A, Bermudez H, Melgar B, Ribera B: Estudio epidemiológico, clínico y terapéutico del Chagas Agudo en Santa Cruz–Bolivia. *Boletín Informativo CENETROP* 1979, 5:2-16.
102. Ribera B: Aspectos socioeconómicos y culturales de la enfermedad de Chagas. In: *Ann Soc Belg Med Trop.* 1985; 1-8.
103. Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Noireau F: Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Trop Med Int Health.* 2007; 12(6):759-764.
104. Romaña C: Enfermedad de Chagas. *López Libreros, Buenos Aires* 1963.

105. Romero D, Borda P, Davalos A: Enfermedad de Chagas. *La Paz, Bolivia* 1978, p 15.
106. Roos, MH, et al. "Polymorphic DNA markers in the genome of parasitic nematodes." *J helminthol.* 1998; 72(4): 291-294.
107. Roush RT, and John A. McKenzie. "Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance." *Annual review of entomology* 32.1 (1987): 361-380.
108. Roush RT, and Joanne C. Daly. "The role of population genetics in resistance research and management." *Pesticide resistance in arthropods.* Springer US. 1990; 97-152.
109. Santo Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI: Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol.* 2008; 45(2):298-306.
110. Sokal R, Rolf J. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company; New York, NY: 1995.
111. Schachter-broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gürtler RE: Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol.* 2004; 41(4):643.
112. Schofield CJ. Biosystematics of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist.* 1988; 163:123-250
113. Schofield C: Triatominae: biology & control: Eurocommunica Publications; 1994.
114. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R: The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12):583-588.
115. Silveira AC, Rezende Dd: Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994; 27(Supl III):11-22.
116. Silva LJ. Desbravamento, agricultura e doença: A doença de Chagas no Estado de São Paulo. *Cad. Saude Pub.* 1986;2(2):124-140.

117. Silveira AC: O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. In: OPS. El Control de la Enfermedad de Chagas en los Países del Cone Sur de América. *História de una Iniciativa Internacional*, 1991/2001. Brasília. 2002:15-43..
118. Slatkin M. Gene flow and population structure. *Ecological genetics*, L. A. Real (ed.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey.1994. 3-18.
119. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 1995;139(1):457-62.
120. Toloza AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI: Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2008; 45(3):421-426.
121. Tonn R: Aspectos biológicos, ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848),(Hemiptera, Reduviidae), en Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 1978.
122. USAID-Bolivia. Proyecto integrado de seguridad alimentaria / USAID BOLIVIA. EDH-I-I2-05-00005-00. 2011. http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00J2T7.pdf. Accessed 25 Feb 2014.
123. Vazquez-Prokopec GM, Cecere MC, Canale DM, Gürtler RE, Kitron U: Spatiotemporal patterns of reinfestation by *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in a rural community of northwestern Argentina. *J Med Entomol*. 2005; 42(4):571-581.
124. Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN. Insecticide Resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol*.2000; 14, 1-5.
125. Vassena CV, Picollo MI. Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la enfermedad de Chagas. *Rev Toxicol*.2003; 3:1-21.
126. World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, 905:109; 2002.

127. World Health Organization (WHO): Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. In., vol. 6; 2015: 33-34.
128. World Health Organization (WHO): Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatomíneos. *Acta Toxicol Arg.* 1994; 2:29-32.
129. Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics.* 193;1 (16): 97-159.
130. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW: Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005; 35(2):225-233.
131. Zerba E: Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina.* 1999; 59(2):41-46.
132. Zerba EN, Picollo MI. Resistencia a insecticidas piretróides en *Triatoma infestans*. *Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) CITEFA-CONICET.* Buenos Aires, Argentina; 2002.
133. Zuna H, La Fuente C, Valdez E, Recacoechea M, Franco J, Romero A, Bermudez H: Estudio prospectivo de la transmisión del *Trypanosoma cruzi* por vía sanguínea en Bolivia. *Ann Soc Belge Med Trop.* 1985; 65(Suppl 1):107-113.

9. ANEXO

9.1 Anexo 1. Pontos Georeferenciados das 73 comunidades existentes no município de Toro Toro.

Comunidades	UDs avaliadas	UDs positivas	Latitude	Longitude
Aguas Calientes	25	2	-65,6847	-18,1164
Alcani	148	0	-65,5778	-18,2905
Añahuani	1056	28	-65,6446	-18,2293
Arafani	103	4	-65,7837	-18,2329
Arapampa	23	0	-65,9031	-18,1192
Araria	194	0	-65,846	-18,1258
Cala Cala	101	4	-65,9014	-18,0428
Calahuta	734	54	-65,7611	-18,0612
Cañada	251	7	-65,6654	-18,1774
Carasi	626	7	-65,6889	-18,3137
Chancarani	70	4	-65,7449	-18,2026
Condor Pampa	53	1	-65,7586	-18,2565
Cruz Kasa	370	0	-65,6472	-18,2747
Cusi Cusi	106	0	-65,8609	-18,0335
Cuñurani	254	15	-65,7089	-18,1671
Estrella Kasa	52	0	-65,746	-18,187
Estrellani	105	0	-65,7751	-18,1572
Habas Kasa	20	0	-65,8328	-18,1753
Hacienda Loma	115	3	-65,7642	-18,1126
Huara Huara	186	2	-65,7564	-18,2351
Huayllas	163	2	-65,7013	-18,1444

Huayra Kasa	273	5	-65,8032	-18,1115
Inca Corral	76	0	-65,8361	-18,0653
Julo Chico	791	47	-65,7957	-18,0187
Julo Grande	637	23	-65,7863	-18,0319
Kara Pampa	77	0	-65,8811	-18,1711
Kehuayllani	365	28	-65,6901	-18,1046
Kirusillani	66	1	-65,7855	-18,2586
Kirusmayu	222	12	-65,8466	-17,999
Laguna	95	0	-65,8147	-18,0819
Laime Aceroma	61	0	-65,7025	-18,2257
Laime Cotani	61	0	-65,7595	-18,2028
Lamadera	117	3	-65,7131	-18,301
Liste	241	22	-65,652	-18,3419
Lupi Lupi	39	0	-65,8444	-18,1791
Mojon Kasa	132	3	-65,8171	-18,1628
Molle Cancha	338	0	-65,7424	-18,157
Omereque	148	13	-65,6592	-18,3023
Ovejeria	102	0	-65,8836	-18,0908
Palla Palla	267	0	-65,5263	-18,3383
Paloma Pampa	177	11	-65,6332	-18,3216
Pampa Rancho	282	9	-65,6881	-18,3254
Pampajasi	281	12	-65,5697	-18,3425
Paychata	189	6	-65,6421	-18,1696
Piruhata	109	5	-65,8177	-18,2125
Pocoata Aceroma	55	0	-65,6679	-18,255
Pocosuco Chico	40	1	-65,739	-18,2902

Pocosuco Grande	194	0	-65,7357	-18,2517
Pucara	332	8	-65,4156	-18,3956
Punta Aguada	135	5	-65,4835	-18,3633
Qhullpa Potrero	228	7	-65,6698	-18,3181
Quioma	266	20	-65,6057	-18,1941
Rancho Pampa	340	19	-65,7586	-18,257
Rodeo Escalon	342	0	-65,7309	-18,1671
Sacabamba	58	0	-65,738	-18,2899
Saychani	22	0	-65,7683	-18,2681
Saychani Chico	38	2	-65,7739	-18,2911
Saychani Grande	12	1	-65,7845	-18,2837
Sucusuma	638	46	-65,7366	-18,0732
Taconi	137	2	-65,4874	-18,3564
Tambo Kasa	716	8	-65,7973	-18,1777
Tipa Kasa	108	6	-65,5347	-18,2772
Tolabamba	217	4	-65,7867	-18,2107
Toro Toro	1015	1	-65,7632	-18,1343
Tunazani	296	3	-65,9112	-18,062
Vaqueria	98	0	-65,8712	-18,1353
Viluyo	402	4	-65,8202	-18,1317
Vila Kasa	131	0	-65,7678	-18,1407
Viña Pampa	67	1	-65,8728	-18,0069
Viscachani	30	0	-65,802	-18,172
Yambata	615	2	-65,9467	-18,0399
Yunguillas	76	7	-65,5354	-18,2598
Yunguma	80	0	-65,8856	-18,1066

9.2 Anexo 2. Número de UDs, nas comunidades de Taqó Taqó (TQ), Julo Chico (JC), Julo Grande (JG) e Calahuta (CA), e local de captura antes e após a intervenção química.

COD	Ambiente (I,P,S)	Latitud	Longitud	Especie	Aplicação topica de inseticida (1º Etapa)	Aplicação topica de inseticida (2º Etapa)
TQ-1a	Casa	18°00'44,8"	65°48'29,9"			
TQ-1b	Curral de cabras (P)	18°00'45,1"	65°48'30,4"	<i>T. infestans</i>	X	
TQ-2	Casa	18°00'48,6"	65°48'05,2"	-		
TQ-3	Casa	18°00'49,6"	65°48'06,4"	-		
TQ-4	Casa	18°00'50,1"	65°48'04,7"	-		
TQ-5	Casa	18°00'40,2"	65°48'35,2"	-		
TQ-6	Casa	18°00'43,5"	65°48'31,5"	-		
TQ-7	Casa	18°00'42,1"	65°48'32,7"	-		
TQ-8	Casa	18°00'41,1"	65°48'33,2"	-		
TQ-9	Casa	18°00'41,0"	65°48'33,1"	-		
TQ-10	Casa	18°00'40,2"	65°48'35,2"	-		
JC-1a	Cozinha (I)	18°01'34,0"	65°47'20,8"	<i>T. infestans</i>		
JC-2a	Parede de cozinha (I)	18°01'30,3"	65°47'29,1"	<i>T. infestans</i>	X	X
JC-3a	Deposito (I)	18°01'16,9"	65°47'46,8"	<i>T. infestans</i>	X	
JC-3b	Curral de cabras e galinheiro (P)	18°01'16,3"	65°47'45,8"	<i>T. infestans</i>	X	
JC-4b1	Curral de cabras (P)	18°01'14,6"	65°47'48,2"	<i>T. infestans</i>	X	
JC-5b	Amontoado de tejas (P)	18°01'15,6"	65°47'46,0"	<i>T. infestans</i>		
JC-6a	Sede (I)	18°01'8,33"	65°47'50,89"	<i>T. infestans</i>		
JC-7b	Galinhheiro (P)	18°00'55,00"	65°48'3,05"	<i>T. infestans</i>	X	
JC-8b	Curral de cabras (P)	18° 1'20,30"	65°47'38,14"	<i>T. infestans</i>		X
JC-9	Casa	18°01'30,7"	65°47'26,0"	-		
JC-10	Casa	18°01'31,7"	65°47'27,8"	-		
JC-11	Casa	18°01'30,5"	65°47'28,2"	-		
JC-12	Casa	18°01'28,3"	65°47'29,1"	-		
JC-13	Casa	18°01'16,7"	65°47'46,4"	-		
JC-14	Casa	18°01'16,53"	65°47'46,06"	-		
JC-15	Casa	18°01'14,92"	65°47'45,30"	-		
JC-16	Casa	18°01'14,04"	65°47'46,05"	-		
JC-17	Casa	18°01'13,79"	65°47'47,79"	-		
JC-18	Casa	18°01'12,64"	65°47'47,44"	-		
JC-19	Casa	18°01'12,89"	65°47'48,79"	-		

JC-20	Casa	18°01'11,90"	65°47'50,79"	-		
JC-21	Casa	18°01'10,22"	65°47'51,00"	-		
JC-22	Casa	18° 01'9,34"	65°47'51,95"	-		
JC-23	Casa	18°01'10,32"	65°47'52,50"	-		
JC-24	Casa	18°00'54,82"	65°48'2,85"	-		
JC-25	Casa	18°00'49,6"	65°48'06,4"	-		
JC-Sil	Afloramento rochoso (S)	18°00'59,0"	65°48'14,7"	<i>T. infestans</i>	X	
JG-1b	Curral de cabras (P)	18°02'25,7"	64°47'27,2"	<i>T. infestans</i>	X	
JG-2a	Cozinha (I)	18°02'15,1"	65°47'15,1"	<i>T. infestans</i>		
JG-3a	Cozinha (I)	18°02'24,0"	65°47'22,8"	<i>T. infestans</i>	X	X
JG-4a	Dormitório (I)	18°02'20,3"	65°47'37,0"	<i>T. infestans</i>	X	X
JG-4b	Muro de pedra (P)	18°02'20,3"	65°47'37,0"	<i>T. infestans</i>		X
JG-4b1	Galinheiro (P)	18°02'21,3"	65°47'38,0"	<i>T. infestans</i>		X
JG-5a	Cozinha (I)	18°02'18,0"	65°47'37,7"	<i>T. infestans</i>		X
JG-5a1	Banco de madeira (I)	18°02'18,0"	65°47'37,7"	<i>T. infestans</i>		X
JG-6a	Dormitório (I)	18°02'25,78"	65°47'36,0"	<i>T. infestans</i>	X	X
JG-6b	Curral de cabras (P)	18°02'25,8"	65°47'36,5"	<i>T. infestans</i>		
JG-7	Casa	18°02'15,3"	65°47'12,5"	-		
JG-8	Casa	18°02'12,8"	65°47'13,8"	-		
JG-9	Casa	18°02'12,8"	65°47'13,8"	-		
JG-10	Casa	18°02'12,8"	65°47'13,8"	-		
JG-11	Casa	18°02'25,2"	65°47'24,7"	-		
JG-12	Curral-cabra (P)	18°02'18,0"	65°47'37,7"	-		
JG-13	Casa	18°02'20,3"	65°47'36,9"	-		
JG-14	Casa	18°02'10,5"	65°47'17,1"	-		
JG-15	Casa	18°02'09,2"	65°47'17,0"	-		
JG-16	Casa	18°02'09,2"	65°47'17,1"	-		
JG-17	Casa	18°02'09,2"	65°47'17,3"	-		
JG-18	Casa	18°02'04,7"	65°47'14,8"	-		
JG-19	Casa	18°02'02,7"	65°47'15,7"	-		
JG-20	Casa	18°02'01,2"	65°47'14,9"	-		
JG-21	Casa	18°02'00,6"	65°47'14,5"	-		
JG-22	Casa	18°02'01,6"	65°47'18,0"	-		
JG-23	Casa	18°02'01,6"	65°47'18,0"	-		
JG-24	Casa	18°02'02,0"	65°47'17,0"	-		
JG-25	Casa	18°01'59,9"	65°47'18,4"	-		
JG-26	Casa	18°01'58,9"	65°47'17,3"	-		
JG-27	Casa	18°02'10,4"	65°47'45,6"	-		
JG-28	Casa	18°02'24,5"	65°47'40,1"	-		

JG-Silv	Faralhon de rochas (S)	18°01'52,0"	65°45'17,5"	<i>T. infestans</i>	X	X
CA-1b	Amontoada de madeira (P)	18°03'40,8"	65°45'48,1"	<i>T. infestans</i>	X	
CA-2b	Curral de porco e galinheiro (P)	18°03'58,0"	65°45'36,2"	<i>T. infestans</i>	X	X
CA-3a	Casa	18°04'13,7"	65°45'35,8"	-		
CA-3b	Curral de cabras (P)	18°04'13,7"	65°45'35,8"	<i>T. infestans</i>		X
CA-3b	Curral de cabras (P)	18°04'13,7"	65°45'35,8"	<i>T. sordida</i>		X
CA-4a	Dormitório (I)	18°04'11,1"	65°45'26,0"	<i>T. infestans</i>		
CA-5b	Curral de cabras (P)	18°04'01,2"	65°45'34,0"	<i>T. infestans</i>	X	X
CA-5b1	Casa de cães (P)	18°04'00,9"	65°45'33,2"	<i>T. infestans</i>	X	
CA-6	Casa	18°03'42,1"	65°45'47,9"	-		
CA-7	Casa	18°03'41,3"	65°45'47,5"	-		
CA-8	Casa	18°03'42,5"	65°45'43,9"	-		
CA-9	Casa	18°03'48,2"	65°45'40,3"	-		
CA-10	Casa	18°03'51,1"	65°45'39,3"	-		
CA-11	Casa	18°03'53,7"	65°45'40,9"	-		
CA-12	Casa	18°03'53,9"	65°45'40,0"	-		
CA-13	Casa	18°03'54,1"	65°45'40,2"	-		
CA-14	Casa	18°03'54,9"	65°45'39,1"	-		
CA-15	Casa	18°03'58,0"	65°45'36,2"	-		
CA-16	Casa	18°03'59,0"	65°45'36,7"	-		
CA-17	Casa	18°03'59,4"	65°45'36,0"	-		
CA-18	Casa	18°03'59,7"	65°45'36,1"	-		
CA-19	Casa	18°04'01,1"	65°45'35,5"	-		
CA-20	Casa	18°04'00,3"	65°45'35,0"	-		
CA-21	Casa	18°04'00,8"	65°45'34,6"	-		
CA-22	Casa	18°04'11,9"	65°45'33,3"	-		
CA-23	Casa	18°04'14,7"	65°45'36,7"	-		
CA-24	Casa	18°04'15,6"	65°45'39,0"	-		
CA-25	Casa	18°04'16,7"	65°45'47,7"	-		
CA-26	Casa	18°04'16,7"	65°45'47,7"	-		
CA-27	Casa	18°04'15,5"	65°45'48,7"	-		
CA-28	Casa	18°04'17,1"	65°45'52,2"	-		
CA-29	Casa	18°04'10,6"	65°45'43,4"	-		
CA-30	Casa	18°04'09,6"	65°45'25,8"	-		
CA-31	Casa	18°04'07,6"	65°45'26,5"	-		
CA-32	Casa	18°04'12,0"	65°45'26,1"	-		

I: intradomiciulio, P: peridomicílio, S: silvestre