



El Colegio de la Frontera Sur

**Detección de *Onchocerca volvulus* en *Simulium metallicum* Bellardi, 1859 en el Foco Sur de Chiapas**

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Ana Patricia Rodríguez Castillejos

2009



El siguiente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (Cd. Reynosa, Tamaulipas), bajo la dirección del M. en C. Cristian Lizarazo Ortega. Fue financiado por el IPN (Proyecto SIP No. 20080705) titulado “Detección de *Onchocerca volvulus* en *Simulium metallicum* en el foco sur de Chiapas”.

# ÍNDICE

|      |   |     |
|------|---|-----|
| I.   | ÍNDICE DE FIGURAS.....  | li  |
| II.  | ABREVIATURAS.....   | lii |
| III. | RESUMEN.....  | lv  |
| 1.   | INTRODUCCIÓN.....   | 1   |
| 2.   | GENERALIDADES.....  | 3   |
|      | 2.1 Distribución de la enfermedad.....  | 3   |
|      | 2.2 Taxonomía y ciclo biológico de los simúlidos.....                               | 7   |
|      | 2.2.1 Ciclo biológico de <i>Simulium metallicum</i> Bellardi, 1859.....             | 10  |
|      | 2.3 Ciclo Biológico de <i>O. volvulus</i> .....                                     | 11  |
|      | 2.4 Manifestaciones clínicas de la oncocercosis.....                                | 13  |
|      | 2.4.1 Nódulos.....  | 13  |
|      | 2.4.2 Manifestaciones oculares.....   | 13  |
|      | 2.4.3 Manifestaciones dérmicas.....   | 15  |
|      | 2.5 Programa de control de la oncocercosis.....                                     | 15  |
|      | 2.6 Tratamiento para la oncocercosis.....   | 16  |
|      | 2.6.1 Ivermectina.....  | 17  |
|      | 2.7 Diagnóstico de la oncocercosis.....   | 18  |
|      | 2.7.1 Diagnóstico parasitológico.....   | 18  |
|      | 2.7.2 Diagnóstico inmunológico.....   | 19  |
|      | 2.7.3 Diagnóstico molecular.....  | 19  |
| 3.   | ANTECEDENTES.....   | 21  |
| 4.   | JUSTIFICACION.....  | 24  |
| 5.   | OBJETIVOS.....  | 26  |
|      | 5.1 Objetivo general.....   | 26  |
|      | 5.2 Objetivos específicos.....  | 26  |
| 6.   | ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....  | 27  |
|      | 6.1 Área de estudio.....  | 27  |
|      | 6.2 Captura de adultos de <i>Simulium spp</i> .....                                 | 28  |
|      | 6.3 Separación de cabezas y cuerpos de <i>S. metallicum s.l.</i> recolectados.....  | 28  |
|      | 6.4 Extracción y Purificación de ADN.....   | 29  |
|      | 6.5 Amplificación por PCR.....  | 29  |
|      | 6.6 Detección de productos de PCR por inmunoensayo (ELISA) y su interpretación..... | 31  |
|      | 6.7 Análisis de datos.....  | 32  |
| 7.   | RESULTADOS.....   | 35  |
|      | 7.1 Datos generales del estudio.....  | 35  |
|      | 7.2 Estudio entomológico.....   | 36  |
| 8.   | DISCUSIÓN.....  | 41  |
| 9.   | CONCLUSIONES.....   | 47  |
| 10.  | BIBLIOGRAFÍA.....   | 48  |
| 11.  | APÉNDICES.....  | 55  |
| 12.  | ANEXO.....  | 56  |
| 13.  | GLOSARIO.....   | 57  |

## I. INDICE DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Distribución de la oncocercosis.....  | 4  |
| <b>Figura 2.</b>  | Distribución de la oncocercosis en América Latina.....  | 5  |
| <b>Figura 3.</b>  | Distribución de la oncocercosis en México.....  | 6  |
| <b>Figura 4.</b>  | Ciclo de vida de los simúlidos.....   | 9  |
| <b>Figura 5.</b>  | Ejemplar de <i>S. metallicum</i> .....  | 10 |
| <b>Figura 6.</b>  | Ciclo biológico de <i>O. volvulus</i> .....   | 12 |
| <b>Figura 7.</b>  | Detección de productos de PCR con la sonda OVS2 por ELISA.....  | 14 |
| <b>Figura 8.</b>  | Área de estudio.....  | 27 |
| <b>Figura 9.</b>  | Detección de productos de PCR con la sonda OVS2 por ELISA.....  | 30 |
| <b>Figura 10.</b> | Tasa de infección en <i>S. metallicum</i> , expresada por cada 2,000 moscas, para comunidades del foco Sur de Chiapas.            | 38 |
| <b>Figura 11.</b> | PT de las dos comunidades con lotes de cabezas positivos (L3/persona/estación).....   | 40 |
| <b>Tabla 1.</b>   | Número de <i>S. metallicum</i> recolectados en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas.....                                     | 35 |
| <b>Tabla 2.</b>   | Número de lotes formados de <i>S. metallicum</i> recolectados en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas.....                   | 36 |
| <b>Tabla 3.</b>   | Prevalencia de infección (expresada en una tasa por 2,000 moscas examinadas) en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas.....    | 36 |
| <b>Tabla 4.</b>   | Prevalencia de infectividad (expresada en una tasa por 2,000 moscas examinadas) en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas..... | 37 |
| <b>Tabla 5.</b>   | Tasa de picadura y potencial estacional de transmisión en dos comunidades del foco sur de Chiapas.....                            | 39 |

## II. ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| ADN   | Ácido desoxirribonucleico  |
| ELISA | Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (Enzyme-Linked Inmunoabsorbent Assay)                                    |
| IACO  | Conferencia Interamericana sobre Oncocercosis (Inter-American Conference of Onchocerciasis)                      |
| L3    | Larvas del tercer estadio  |
| Mf    | Microfilarias  |
| Msnm  | Metros sobre el nivel del mar  |
| OCP   | Programa de Control de Oncocercosis en el Oeste de África (Onchocerciasis Control Programme in West Africa)      |
| OEPA  | Programa de Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (Onchocerciasis Elimination Program for the Americas) |
| OMS   | Organización Mundial de la Salud   |
| PCR   | Reacción en cadena de la Polimerasa  |
| s.l.  | sensu lato (en sentido amplio)   |
| WHO   | Organización Mundial de la salud (World Health Organization)   |
| MI    | Microlitros  |

## DETECCIÓN DE *Onchocerca volvulus* EN *Simulium metallicum* Bellardi, 1859 EN EL FOCO SUR DE CHIAPAS

### RESUMEN

Desde hace más de un siglo, la oncocercosis es un problema de salud pública en África y América Latina. En México, el principal vector de la oncocercosis es *Simulium ochraceum* y, *S. metallicum* es considerado vector secundario. En comunidades del foco sur de Chiapas, la presencia de nódulos en niños menores de cinco años indica evidencia de infección con el parásito, y transmisión residual dado que todavía existen *S. ochraceum* infectados con *Onchocerca volvulus*. El objetivo de este trabajo fue determinar si *S. metallicum* también es transmisor del parásito en esas comunidades y pudiera estar contribuyendo al mantenimiento de la transmisión de *O. volvulus*. Los simúlidos fueron recolectados, utilizando la técnica de cebo humano, durante la época de mayor transmisión del parásito. Los simúlidos fueron agrupados y se extrajo ADN para la amplificación del gen O-150. Los productos de la PCR fueron detectados por ELISA. Se recolectaron un total de 13,750 ejemplares de *S. metallicum* en cinco comunidades: Estrella Roja, Primero de Mayo, Las Golondrinas, Nueva Reforma y José María Morelos. De los lotes de cuerpos examinados de *S. metallicum* resultaron ocho positivos, procedentes de las comunidades Primero de Mayo y Nueva Reforma Agraria. De las comunidades donde se obtuvo lotes de cuerpos positivos, se analizaron 201 lotes de cabezas obteniéndose una tasa de infectividad de 0.29 (I.C 95% 0.0003-0.78). Los datos sugieren que *S. metallicum* es también vector del parásito en ambas comunidades. Sería interesante analizar un mayor número de *S. metallicum* para confirmar que este también es el responsable del mantenimiento de la transmisión residual en comunidades del foco Sur de Chiapas.

### Abstract

Human onchocerciasis is caused by the nematode *Onchocerca volvulus* and it is transmitted by black flies of the genus *Simulium*. *Simulium ochraceum* is the predominant vector species at Mexico and Guatemala, nevertheless *Simulium metallicum* and *Simulium callidum* are considered secondary vectors of the *O. volvulus*. In México there are three endemic foci, Southern and Northern Chiapas and Oaxaca. The Southern Chiapas focus is the biggest. In some sentinel communities of the Southern focus the transmission could be interrupted; nevertheless in extra-sentinel communities the last serologic studies suggested that the transmission continued although the entomologic studies on *S. ochraceum* indicate the interruption of the transmission. For this reason is important to evaluate the presence of *O. volvulus* in the secondary vector in Mexico, *S. metallicum*, in endemic communities of Southern Chiapas to evaluate the role of this vector in the onchocerciasis current panorama in this focus. A total of 13,750 *Simulium metallicum* s.l. (275 pools of 50 each), collected in four sentinel and one extra sentinel communities were tested by PCR-ELISA, in two communities resulted body pools positive (1.07 IC 95% 0.49 – 2.08 and the prevalence of infective flies was 0.29 (IC 95% 0.0003 – 0.77). Finally, the transmission potential was 0.970/L3/person in Primero de Mayo, no evidence for transmission was found in the four other communities examined.

## 1. INTRODUCCIÓN

La oncocercosis humana es causada por la infección con el nematodo *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) y se transmite por especies del género *Simulium*, comúnmente denominadas “moscas negras”. La enfermedad también se conoce como ceguera de los ríos, mal morado o erisipela de la costa. Las áreas endémicas se limitan a zonas con latitud, relieve, temperatura y humedad relativa óptimas para el desarrollo del parásito y del insecto vector. Con esas características encontramos el oeste de África, Asia y seis países de América Latina, incluyendo México. Se estima que más de 37 millones de personas están infectadas con el parásito a nivel mundial (Gómez-Priego *et al.*, 2005).

El parásito es transmitido de una persona a otra por la mordedura del vector. El insecto muerde al humano, para alimentarse de sangre y, deposita larvas de tercer estadio (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994); aunque también es posible la transmisión vía transplacentaria. En México y Guatemala el principal vector de la oncocercosis es *Simulium ochraceum* mientras que, *S. metallicum* y *S. callidum*, son considerados vectores secundarios (Vargas, 1960; Castaldi y Ortega, 1981).

La infección con *O. volvulus* puede ocasionar síntomas diversos, que varían de cambios dérmicos a ceguera, en caso de infección grave. La oncocercosis es una infección acumulativa, en la cual la evolución de los síntomas clínicos depende de la frecuencia de exposición a las mordeduras de los simúlidos y la carga de microfilarias en piel. En su fase crónica conlleva a invalidez de los individuos que la padecen. Por lo tanto, la oncocercosis tiene serias consecuencias socio-económicas en las comunidades endémicas de las áreas rurales pobres (Whitworth, 1998).

Las áreas endémicas de oncocercosis en México se localizan en los estados de Oaxaca y Chiapas. El foco endémico más extenso está situado en el sur de Chiapas, contiguo al área de Huehuetenango, Guatemala. Los focos endémicos de México y de Guatemala tienen más del 50% de los casos reportados en América Latina (OEPA, 2008). En esta región endémica México- Guatemala, la oncocercosis está relacionada con plantaciones de café y, el periodo de máxima transmisión coincide con la época de sequía temprana en asociación con la presencia de

poblaciones viejas del vector principal, *Simulium ochraceum* s.l. (Brandling-Bennett *et al.*, 1981; Rodríguez-Pérez y Reyes Villanueva, 1994).

El programa de oncocercosis en México inició el tratamiento con ivermectina en el año 1989, dándose solo a personas positivas a biopsia de piel y/o reacción de Mazzotti que habitaban en las comunidades hiperendémicas. De 1995 a la fecha se suministra en régimen semestral, en todas las comunidades en riesgo y de todos los niveles endémicos. En 50 comunidades del foco Sur de Chiapas desde el año 2003 se tiene un régimen de administración especial de ivermectina, que consiste en suministrar cuatrimestralmente el medicamento. El esquema de tratamiento de dos rondas por año se mantiene en las comunidades centinela y el resto de las comunidades del foco Sur de Chiapas. A partir del año 2003 se lograron coberturas mayores al 85% en los tres focos; se cree que los porcentajes de cobertura por arriba del 85%, mantenidos durante un período superior a los dos años, conducirán a la supresión de la transmisión del parásito.

## **2. GENERALIDADES**

Los artrópodos constituyen un grupo muy numeroso de especies en el reino animal y, una de las principales fuentes de enfermedad. Las enfermedades transmitidas por artrópodos son importantes tanto en número como en su distribución. Aparte de actuar como transmisores, los artrópodos pueden ser causantes directos de enfermedades. En la mayoría de los casos, los parásitos transmitidos por artrópodos primero han sido parásitos de estos últimos y, se han adaptado a ellos de tal manera que no les producen daño (Cruz, 1987).

El parasitismo es una relación biológica tan antigua como la vida misma y, el hombre no se escapa de ser hospedero de otros seres que viven a sus expensas (Cruz, *op cit*). Desde nuestra aparición en la tierra hemos adquirido un gran número de parásitos, algunos de los cuales causan importantes enfermedades (Cox, 2002). Dentro de estas enfermedades se encuentran las infecciones filáricas que son endémicas en regiones tropicales tales como, las filarías linfáticas (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*), la loasis (*Loa loa*) y la oncocercosis (*Onchocerca volvulus*) (Hoerauf *et al.*, 2002).

La oncocercosis es una enfermedad producida por la infección del nematodo *Onchocerca volvulus* y se transmite a través de las mordeduras de los insectos del género *Simulium*. La infección con el parásito puede ocasionar síntomas que varían de cambios dérmicos a ceguera en caso de infección grave.

### **2.1 Distribución de la enfermedad**

La distribución geográfica de la oncocercosis está determinada por el clima y la presencia del vector. La enfermedad es endémica en 37 países, de los cuales 30 son de África, 6 de América Latina y uno de Asia. (Figura 1).



**Figura 1 Distribución de la oncocercosis.** Los países marcados en rojo indican la presencia de oncocercosis en África, Asia y América Latina (Fuente: OMS, 2004).

Se cree que la oncocercosis fue introducida en el nuevo mundo desde África hace aproximadamente 500 años. El primer foco de oncocercosis en América Latina fue documentado en 1915 por el Dr. Rodolfo Robles, en Guatemala; por lo es también conocida en la región como “Enfermedad de Robles”. Desde el descubrimiento, se han delimitado 13 focos oncocercosos en Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela (Figura 2, WHO, 2001).

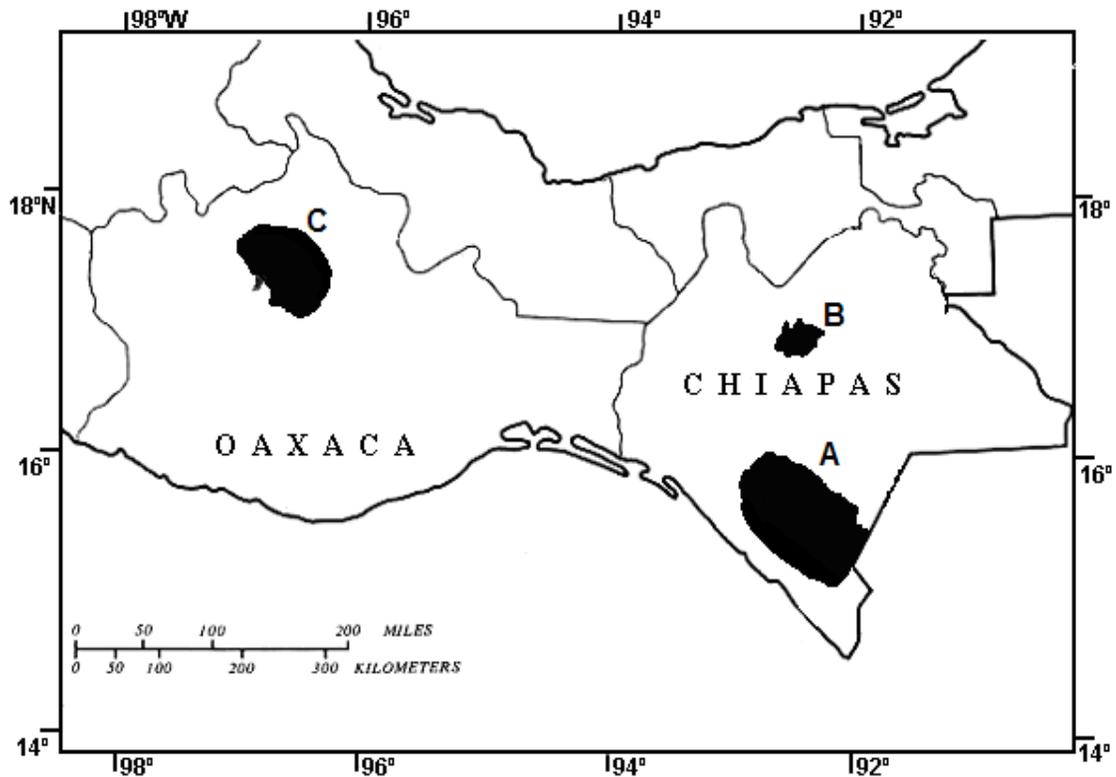
En Guatemala se encuentran cuatro focos, el foco Huehuetenango comprende 43 comunidades; el Central formado por 321 comunidades; el Escuintla con 117 comunidades y el Santa Rosa con 37 comunidades. De las 518 comunidades de este país, 461 son hipoendémicas, 15 mesoendémicas y 42 hiperendémicas. En Colombia hay un foco, denominado López de Micay, que incluye una comunidad con nivel mesoendémico con 1,410 habitantes. Venezuela tiene tres focos oncocercosos, el Nor-central, el Nor-oriental y Sur o Amazonas-Bolívar. En total abarca 625 comunidades, 104 son hiperendémicas, 216 mesoendémicas y 305 hipoendémicas. En Brasil se encuentra el foco Amazonas-Roraima, este foco esta compuesto por 17 comunidades, de las cuales cinco son hiperendémicas, siete mesoendémicas y cinco hipoendémicas. En Ecuador el foco

Esmeraldas-Pichincha incluye 99 comunidades, de las cuales 42 son hiperendémicas (OEPA, 2008).



**Figura 2. Distribución de la oncocercosis en América Latina.** Los seis países en amarillo representan los afectados por oncocercosis, distribuida en trece focos (Fuente: OEPA, 2008).

En México la enfermedad se presenta en tres focos, uno en el Estado de Oaxaca y dos en el Estado de Chiapas. El foco Oaxaca abarca 98 comunidades, de ellas 11 son comunidades mesoendémicas y 87 hipoendémicas. En Chiapas, el foco Chamula, abarca 13 comunidades, todas con nivel hipoendémico y en las cuales residen 7,010 personas. El foco Sur de Chiapas o Soconusco está conformado por 559 comunidades, donde radican 112,885 personas. Treinta y nueve comunidades son hiperendémicas, 209 mesoendémicas y 311 hipoendémicas. Todas las comunidades hiperendémicas de México están en esta región (Martín-Telleché *et al.*, 1998; OEPA, 2008).



**Figura 3 Distribución de la oncocercosis en México.** El mapa indica la ubicación de los tres focos oncocercosos de México: A) Foco Soconusco, B) Foco Chamula y C) Foco Oaxaca.

Aunque no es claro el origen de la enfermedad en América, se sugiere que llegó con los trabajadores africanos traídos a las fincas cafetaleras de Guatemala y posteriormente, en México se descubrieron los primeros casos de la enfermedad en el foco Soconusco, la mayoría de ellos en jornaleros del café provenientes de Guatemala (Vázquez-Castellanos, 1991; Rodríguez-Pérez, *et al.*, 2004). Al parecer, el foco Oaxaca difiere en su origen a los de Chiapas y se cree que puede deberse en parte a los movimientos humanos al sur para realizar peregrinaciones religiosas u otras actividades (Rodríguez-Pérez, 2005).

La población de los focos oncocercosos mexicanos corresponde a diversos grupos étnicos. En el foco Soconusco predomina la población mestiza, pero el 30 % de los pobladores está constituido por descendientes de indígenas originarios de Guatemala o por elementos del grupo tzeltal-tzotzil de la zona norte de Chiapas. El 90% de las zonas oncocercosas de México, está integrado por campesinos, que se dedican principalmente al cultivo del café. En la zona del Soconusco durante las

épocas de siembra y cosecha existe una población flotante de regular magnitud, procedente principalmente de Guatemala (Hernández, 1979).

Tanto en México como en Guatemala los factores físicos que condicionan la existencia de endemia de oncocercosis son: proporciones geográficas con relieve del terreno muy pronunciado, generalmente laderas montañosas, que se ubican entre los 500 y 1200 msnm, clima templado y con oscilaciones reducidas. Además en esta zona se presentan precipitaciones pluviales abundantes y humedad atmosférica elevada; una red hidrográfica constituida por corrientes de escaso caudal y fuerte declive (Chávez, 1979).

## **2.2 Taxonomía y ciclo biológico de los Simúlidos**

La familia Simuliidae es un grupo de dípteros nematoceros muy homogéneos morfológicamente, cuyos estados juveniles se desarrollan en ambientes acuáticos lóticos. Los simúlidos se distinguen fácilmente de otros taxones de dípteros por presentar en el estado adulto el cuerpo robusto, con patas cortas y gruesas, antenas multiarticuladas, el tórax fuertemente convexo dorsalmente y, el ala muy ancha con las venas anteriores gruesas y esclerotizadas; las posteriores delgadas y débiles. El catálogo más reciente de los simúlidos del mundo (Crosskey, 1987) incluye 1,470 especies válidas, clasificadas en dos subfamilias, dos tribus, 23 géneros y 57 subgéneros (Ibáñez-Bernal y Coscarón, 1996).

Según Chester y colaboradores (1988) los estudios de Blacklock, en 1926, demostraron que los insectos del género *Simulium* funcionaban como hospederos intermediarios de las filarias del género *Onchocerca*. Este hallazgo fue confirmado en África por Bequart (1928), en México por Hoffmann y colaboradores (1930) y en Guatemala por Strong (1931).

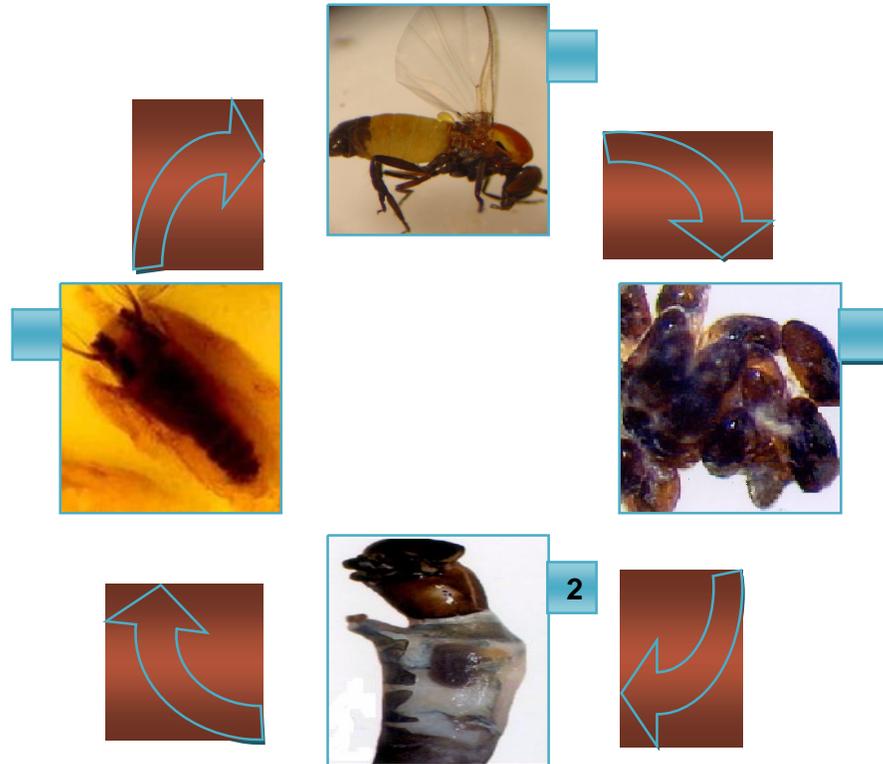
Los simúlidos tienen distribución cosmopolita. Los principales simúlidos transmisores de *O. volvulus* son complejos de especies: *S. damnosum*, *S. guianense*, *S. oyapockense*, *S. ochraceum*, *S. metallicum* y *S. exiguum* (WHO, 1995). En México y Guatemala *S. ochraceum* es el vector principal y *S. metallicum* el vector secundario. En Venezuela son *S. metallicum* s.l. y *S. guianense* s.l.; en Colombia y Ecuador el vector principal es *S. exiguum* s.l. y en Brasil *S. guianense* s.l. es el vector principal (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994).

La transmisión de *O. volvulus* puede variar en lugar y tiempo y depende de varios factores, entre ellos, la relación densidad hombre-vector, susceptibilidad del parásito y, cantidad de parásitos disponibles en la población humana dada. La habilidad para mantener la transmisión por aquellos simúlidos con armadura bucofaríngea, como es el caso de *S. ochraceum s.l.*, depende de las altas tasas de mordedura sobre el humano y la disponibilidad de reservorios de microfilarias. *S. ochraceum s.l.* es capaz de mantener áreas mesoendémicas e hiperendémicas debido a su gran abundancia en ellas y su alta preferencia alimenticia sobre humanos (Rodríguez-Pérez, 2005).

El ciclo de vida de un simúlido pasa por cuatro fases que son: huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 4). Las fases inmaduras son acuáticas. La asociación de estos insectos y de las poblaciones humanas afectadas con el ecosistema acuático de río, es lo que le ha dado en nombre a la oncocercosis de “ceguera de los ríos”.

El ciclo de vida de estos insectos se cumple, en la zona tropical, en aproximadamente 20 días (Ramírez-Pérez, 1977). Las hembras maduran sus huevos (entre 200–500 por mosca) a partir de la ingestión de sangre y los depositan (oviposición) en masas compactas sobre sustratos tales como rocas o piedras, plantas acuáticas y diversos tipos de vegetación sumergida o colgante. Los huevos eclosionan a los 2–4 días posteriores a la oviposición, dando origen a las larvas, las cuales a su vez pasan por 6–9 estadios larvales. Estas permanecen adheridas a los sustratos y se alimentan mediante filtración de microorganismos y materia orgánica en suspensión en la columna de agua. A las 2–3 semanas, se transforman en pupas, y a los pocos días, emergen como adultos (Basañez y Ricardez-Esquinca, 2001).

Las especies tropicales se caracterizan por presentar varias generaciones por año. Posteriormente a la emergencia del adulto a partir de la pupa, la hembra busca un hospedador a fin de procurar una comida sanguínea (Ramírez-Pérez, *op cit*). La actividad de los simúlidos es diurna (desde el amanecer hasta el atardecer), existiendo picos de actividad a determinadas horas del día dependientes de la especie, estación, condición climática, edad fisiológica, la disponibilidad y localización de los hospedadores, y la distancia de los asentamientos humanos en relación con los criaderos del vector.



**Figura 4 Ciclo biológico del género *Simulium*.** El ciclo del vector de la oncocercosis consiste en 4 estadios: huevo (1), larva (2), pupa (3) e insecto adulto (4).

El período gonadotrófico constituye el intervalo de tiempo, usualmente entre 2–4 días en especies tropicales, lo que incluye la búsqueda e ingesta de sangre, la oviposición, y la búsqueda de la próxima comida sanguínea. Una hembra puede sobrevivir varios ciclos gonadotróficos durante su vida. En promedio, la expectativa de vida del vector es de aproximadamente 1–2 semanas, lo cual no debe confundirse con la longevidad máxima que puede ser hasta de 1–2 meses. Ya que el desarrollo del parásito en el vector requiere de aproximadamente una semana; una hembra que haya adquirido microfilarias durante su primera comida sanguínea, podrá transmitir larvas infectantes durante su segunda, o más probablemente, su tercera comida sanguínea. Por lo tanto mientras más longeva sea una hembra, mayor probabilidad tiene de transmitir al parásito *O. volvulus* en caso de que lo haya adquirido previamente.

La transmisión de la oncocercosis en México y Guatemala se produce por la mordedura de tres especies de simúlidos: *S. ochraceum*, *S. metallicum* y *S.*

*callidum*. Las tres especies presentan hábitos alimenticios típicos. *S. ochraceum* se presenta entre los 600 y 1500 m s.n.m. y es altamente antropofílico; *S. metallicum* ocurre entre los 900 y 1500 m s.n.m. y es medianamente antropofílico; y, *S. callidum* se observa entre los 270 y 1800 m s.n.m. y es poco antropofílico (Castaldi y Ortega, 1981).

### 2.2.1 Ciclo biológico de *Simulium metallicum* Bellardi, 1859

En experimentos realizados por Dalmat (1952), el ciclo de vida de *S. metallicum* en condiciones favorables es de 30 a 35 días de huevo a huevo. Una generación comprende dos fases de desarrollo de huevo a imago (adulto) y de estado de vida reproductivo o madurez. El periodo de desarrollo embrionario es de tres días, el posembrionario de 25 días (20 días para completar las seis fases larvianas y cinco para la fase pupal) más de tres meses de vida para la etapa adulta en la naturaleza. Teniendo en cuenta que la hembra copula en las primeras 24 horas subsiguientes a su nacimiento, es de esperar que la primera ovipositora la realice en los tres o cuatro días después del estado pupal. Si se considera que cada ciclo gonotrófico es de 48 horas, o sea el proceso de la digestión de la sangre y desarrollo de los óvulos, una sola hembra puede depositar de 150 a 300 huevos en cada oviposición, por tanto se puede deducir que en tres meses de madurez el insecto efectúa tres o más ovipositoras (Ramírez-Pérez, 1977).



**Figura 5.** *Simulium metallicum* (Fuente: Okazawa y Onishi, 1980)

En los meses más calurosos las generaciones se suceden continuamente, lo que indica que la frecuencia de la natalidad, oviposición y supervivencia es más alta en esta época del año. Debido a las condiciones meteorológicas favorables, es en el verano que la población de larvas y adultos incrementan rápidamente. Las generaciones nacidas en época de lluvias son escasas pues la crecida de los ríos y quebradas traen sedimentos abundantes que arrastran y hacen sucumbir las formas inmaduras (en la figura 5 se muestra un ejemplar de *S. metallicum*). Cuando a principio de septiembre se produce una tregua en las lluvias, aumenta ligeramente la población acuática y adulta. Las generaciones del periodo de tregua sobrepasan las de lluvias, pero son menos numerosas que las de verano (Ramírez-Pérez, 1976).

### **2.3 Ciclo Biológico de *O. volvulus***

El ciclo biológico de *O. volvulus* tiene lugar en dos hospederos, el simúlido es hospedero intermedio y el humano el definitivo (Figura 6). El ciclo del parásito comienza cuando una mosca hembra del género *Simulium*, para alimentarse y completar su ciclo de oviposición, muerde al humano infectado con *O. volvulus*. Entre las dos y seis horas después de la ingestión de la sangre infectada con el parásito, las fases juveniles (microfilarias) de *O. volvulus* migran hacia los músculos torácicos.

A las 24 horas después de la ingestión, el parásito se transforma en larva de primer estadio (L1) o primera fase de Hoffmann. La larva se hace menos activa en la extremidad caudal. A los dos días de la post-ingestión, la larva continúa el proceso de transformación (L2). Las células de la columna de núcleos aumentan de tamaño y comienzan a formar una masa indiferenciada que constituye el futuro intestino. La larva reduce su longitud a 220  $\mu\text{m}$  y el intestino se hace más evidente. A los tres días de desarrollo, el tubo digestivo de la larva está completamente definido (Koneman, 2001). Las larvas mudan al tercer estadio (L3) y migran del hemocele y la musculatura de la mosca a la probóscide. El tiempo promedio de desarrollo hasta el estado infectivo en el vector es de aproximadamente dos semanas (Bogitsh y Cheng, 1998).

Los simúlidos al alimentarse del humano inoculan microfilarias en estadio L3. En el tejido subcutáneo, la microfilaria muda dos veces, pasa del tercer al cuarto estadio larval (L4) el cual se mueve rápido y localiza sitios para la maduración mediante señales químicas. La segunda muda del parásito en el humano ocurre entre uno y dos meses posteriores a la infección. Las larvas del quinto estadio son adultos inmaduros que aún no están listos para producir microfilarias. La maduración sexual del parásito tarda aproximadamente un año. Los gusanos hembras maduros se instalan en nódulos pre-existentes ó forman sus propios nódulos (Duke 1993; Bogitsh y Cheng 1998; Koneman 2001). En promedio, se encuentran de uno a dos machos y de dos a tres hembras en el 80% de los nódulos. La hembra es más grande (20-70 cm x 0.25x0.45 cm) que el macho (5-6 cm x 0.1-0.2 mm), este último se mueve de nódulo en nódulo para inseminar a las hembras (Duke *op cit.*, Engelbrech y Schulz-Key, 1984). La hembra adulta puede liberar de 1300 a 1900 microfilarias por día, teniendo un período fértil de nueve a once años (Burnham, 1998).

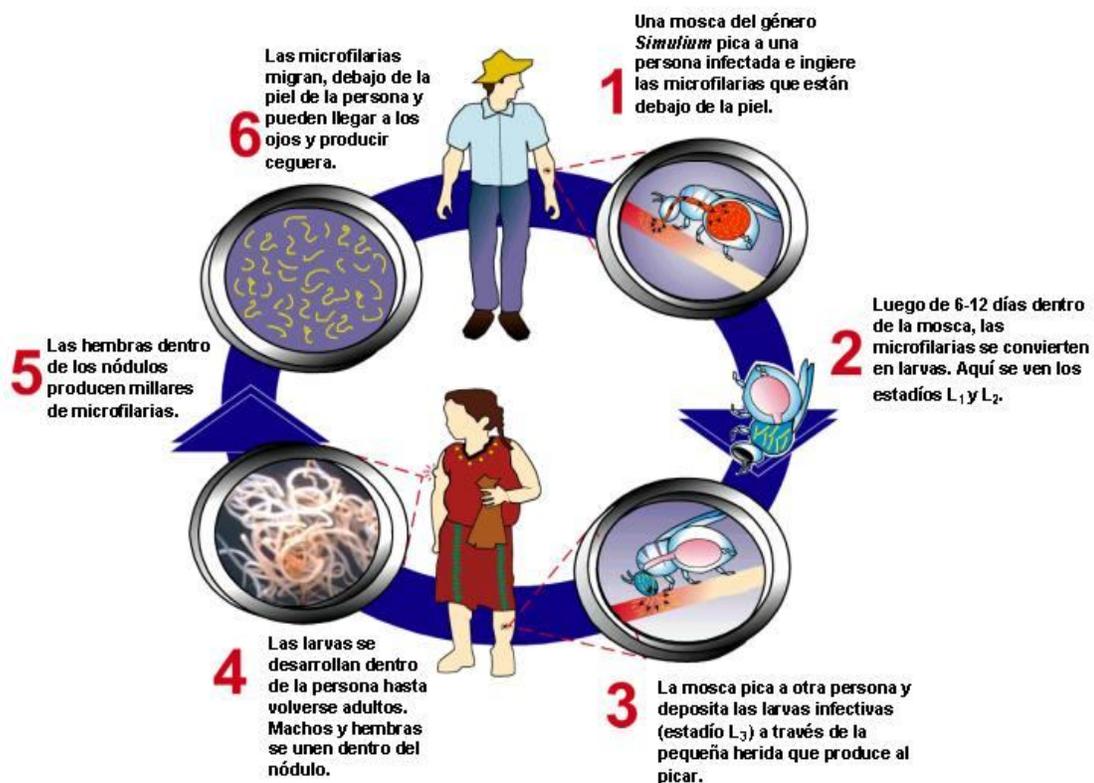


Figura 6. Ciclo biológico de *O. volvulus*. (OEPA, 2008)

El período prepatente, de la infección es de entre 12 a 15 meses. Las microfilarias no se liberan de manera continúa, pero sí en ciclos periódicos. Cada gusano hembra tiene de tres a cuatro ciclos productivos por año; sin embargo, la frecuencia de estos ciclos y producción de microfilarias disminuye conforme avanza la edad del gusano (Schulz-Key y Karam, 1986).

## **2.4 Manifestaciones clínicas de la oncocercosis**

La patogénesis de las enfermedades causadas por filarias se caracteriza por la presencia de inflamación crónica generada por la respuesta inmune del hospedero contra los antígenos del parásito (Magdi, 2006). Dentro de las principales manifestaciones de la enfermedad se encuentran las lesiones dérmicas, que pueden ser leves o graves; la formación de nódulos y las alteraciones oculares que pueden llegar a causar ceguera (Hoerauf *et al.*, 2003).

### **2.4.1 Nódulos**

Los gusanos adultos están encapsulados en nódulos que se localizan en las prominencias óseas sobre la cabeza, el cinturón escapular y pélvico, costillas, trocánteres, rodillas y tobillos. Los nódulos, por lo general, no producen dolor. Sin embargo, se cree que los nódulos en cabeza son factores de riesgo que pueden ocasionar daño ocular (Fuglsang y Anderson, 1977). Su tamaño oscila entre 0.5 y 10 cm (Fig. 7a) y parecen ser producidos por la respuesta inflamatoria del hospedero a las proteínas del gusano, causando infiltración perivascular de leucocitos, linfocitos y fibroblastos (García-Dihinx *et al.*, 2001; Okulicz *et al.*, 2004; Magdi 2006).

### **2.4.2 Manifestaciones oculares**

El síntoma clínico más grave de la oncocercosis es el daño visual, la muerte de las microfilarias en los ojos causa la patología ocular y, las lesiones en ojos pueden ser observadas en individuos con cargas de microfilarias altas o moderadas. Cuando la filaria migra al ojo causa una respuesta inmune inflamatoria

intensa y, dependiendo el grado de severidad, puede destruir por completo el nervio óptico causando ceguera total (Luang-Hui, 2006). La reacción cruzada entre los antígenos del parásito y proteínas presentes en la retina humana puede contribuir al daño ocular (Braun *et al.*, 1991; Hall y Pearlman, 1999). La patología ocular puede manifestarse en cualquier parte del ojo (Fig. 7d), aunque las manifestaciones son más frecuentes en la parte posterior o anterior. Cuando el parásito muere, inicia una respuesta inflamatoria local y causa la formación de áreas opacas parecidas a copos de nieve (queratitis punteada). Como resultado de una exposición continua al parásito, las zonas opacas aumentan hacia la periferia, dejando el área central clara y frecuentemente tienen muchos parásitos. Las zonas opacas progresan hacia el centro produciendo una inflamación crónica con formación fibrovascular (queratitis esclerosante) que obscurece completamente la córnea y causa una la pérdida de la visión. La queratitis esclerosante es un daño irreversible (Pearlman y Lass, 1994; Abiose, 1998; Hall y Pearlman *op. cit*; Egbert *et al.*, 2005; Rodríguez-Pérez 2005).



**Figura 7. Manifestaciones clínicas.** Las principales manifestaciones clínicas de la oncocercosis son los nódulos (a), las lesiones dérmicas como la erisipela de la costa (b), la despigmentación (c) y las lesiones oculares (d) (Fuente: Centro Carter 2006).

### **2.4.3 Manifestaciones dérmicas**

La patología de la dermis está asociada con la presencia de microfilarias. La gravedad de la patología depende de la respuesta inmune del hospedero humano en contra de la infección o quizás, de la frecuencia de exposición al simúlido (Murdoch *et al.*, 1993). En la piel, las manifestaciones clínicas más frecuentes son: piel edematosa, tensa y caliente, enrojecimiento, prurito y ardor. Estas manifestaciones en conjunto provocan un síndrome conocido como “erisipela de la costa”. La presencia de lesiones cutáneas degenerativas y crónicas que se localizan en piernas, brazos, pabellones auriculares, cara y cuello, y en los sitios anatómicos donde se forman pliegues colgantes dan al paciente un aspecto de vejez prematura (Fig. 7 b y c) (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994). El primer signo objetivo de la oncocercosis es una alteración de la pigmentación, con la aparición de zonas de hiperpigmentación, siguiendo un patrón macular o de manchas irregulares. La patología dérmica de la enfermedad se asocia con la presencia de microfilarias.

### **2.5. Programa de control de la oncocercosis**

La Organización Mundial de la Salud considera a la oncocercosis como un problema de salud pública, por ello se han implementado diversos programas de control y eliminación de la enfermedad (Hoerauf *et al.*, 2003). En 1987 se descubrió la ivermectina y la compañía Merck® decidió donarla a los países afectados por oncocercosis. Para la distribución del medicamento se crearon dos programas de control: El Programa de Control de Oncocercosis en África (APOC) y el Programa de Eliminación para la Oncocercosis en las Américas (OPEA) (Blanks *et al.*, 1998; Rodríguez-Pérez, 2005; Boatin y Richards, 2006).

En América Latina se implementó, en 1993, el Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas, con el fin de lograr la eliminación de la infección teniendo como primer objetivo, el lograr la interrupción de la transmisión. Este programa ha logrado eliminar muchas de las manifestaciones patológicas de la enfermedad a través de la distribución de ivermectina (Cupp *et al.*, 2004; Gómez-Priego *et al.*, 2005). Los objetivos del programa para la eliminación de la oncocercosis, tanto en México como en los otros países endémicos en América

Latina, son básicamente tres; el control de la morbilidad, eventual supresión e interrupción de la transmisión y eliminación de la infección. La estrategia del programa consiste en administrar, de manera masiva, ivermectina dos rondas de tratamiento por año en las áreas endémicas para reducir la morbilidad e interrumpir la transmisión del parásito (Blanks 1998; IACO, 2001).

En México, la oncocercosis se controla por medio de distribución vertical de ivermectina y de nodulectomía (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994); las actividades son realizadas por brigadistas dentro de un programa especial de la Secretaría de Salud denominado programa de eliminación de la oncocercosis. Con el uso de estas medidas de control se ha logrado disminuir la prevalencia y la incidencia de oncocercosis, se ha prevenido la ceguera, han abatido las lesiones dérmicas en aquellos individuos infectados por esta parasitosis y ha disminuido, de manera notable, la intensidad de transmisión. El programa no contempla ninguna medida de control del vector (Rodríguez-Pérez y Rivas-Alcalá, 1991; Rodríguez-Pérez *et al.*, 1995). La distribución masiva de ivermectina es la estrategia de intervención fundamental dentro de los programas de control actuales, por lo que es importante discutir la evidencia de su efecto sobre la morbilidad y la transmisión de la oncocercosis para el logro de los objetivos de la iniciativa regional.

## **2.6 Tratamiento para la oncocercosis**

El fármaco Hetrazán® (diethylcarbamazine) fue una de las primeras sustancias que se utilizaron en el tratamiento de la oncocercosis. Esta droga se administraba a razón de 10 mg/kg/día durante tres semanas. El Hetrazán® produce la muerte masiva e inmediata de las microfilarias, por lo que se producen reacciones secundarias graves como cefalea, edema de párpados y de miembros, así como erupción pruriginosa (Rodríguez-Pérez y Rivas-Alcalá, 1991). La Suramina, es el único medicamento sintético adulticida, sólo ha sido empleado en etapa experimental. Esta droga tiene un fuerte efecto nefrotóxico. En la actualidad no se cuenta con una vacuna o droga adulticida, segura y tolerable contra la oncocercosis, sólo existen programas de control que conjugan el tratamiento con ivermectina y la nodulectomía (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994).

Recientemente se ha encontrado, que las bacterias endosimbióticas, como *Wolbachia* para el caso de *O. volvulus*, son importantes en la actividad reproductiva

y longevidad del parásito; los cuales se ven seriamente afectadas al eliminar dichas rickettsias. Sin embargo, los regímenes de tratamiento son prolongados (seis semanas con 100 mg diarios de doxiciclina), y se estima que su mayor utilidad será en las etapas finales de los programas, a fines de eliminar los últimos vestigios de infección en individuos que puedan identificarse y tratarse selectivamente (Hoerauf *et al.*, 2003).

### **2.6.1 Ivermectina**

La ivermectina es un producto semi-sintético, derivado de una lactona macrocíclica del actinomiceto *Streptomyces avermectilis*. Esta droga destruye las microfilarias con lo que se eliminan las formas causantes de sintomatología, particularmente en individuos con infecciones elevadas. Esta droga fue usada en el área de salud veterinaria por muchos años, hasta que en 1982 se demostró que era efectiva contra la oncocercosis humana (Aziz *et al.*, 1982). Sin embargo, debido a que no destruye a los adultos productores de microfilarias, no erradica la enfermedad. Se supone que para erradicar la enfermedad la droga tiene que administrarse en esquema semestral por lo menos durante 15 años, que es el tiempo de vida media del gusano adulto (Rodríguez Pérez y Rodríguez López, 1994). La dosis oral terapéutica recomendada es de 150 µg/kg de peso; se excluye del tratamiento con ivermectina a los niños menores de cinco años de edad o debajo de los 15 kg de peso, a las mujeres embarazadas, a las mujeres en período de lactancia (dentro de las primeras semanas posterior al parto), a los individuos con desórdenes neurológicos y a los individuos con enfermedad grave intercurrente y/o alérgicos a la droga.

La ivermectina actúa sobre un receptor del complejo neurotransmisor inhibitorio del ácido gama-aminobutírico (GABA). Se demostró que la ivermectina es un inhibidor competitivo de los sitios específicos 3H-GABA de nemátodos. En los nemátodos y artrópodos, el GABA controla la neurotransmisión, inhibiendo las neuronas motoras. La ivermectina potencializa las señales inhibitorias generando parálisis flácida en el parásito. Debido a que el GABA y sus receptores en los mamíferos están confinados al sistema nervioso central y, a que el fármaco no atraviesa la barrera hematoencefálica, el producto no ejerce efectos semejantes en el humano. La interacción de la ivermectina con los receptores específicos GABA en

*O. volvulus* tiene un efecto tóxico directo sobre las microfilarias que limita su movilidad e inicialmente suprime la reproducción de las mismas (Ros-Moreno *et al.*, 1999).

Los efectos adversos reportados con mayor frecuencia después de las primeras administraciones de ivermectina incluyen reacciones cutáneas, prurito, dolores músculo-esqueléticos, fiebre, edema de cara, articulaciones y miembros, dolores de cabeza y vértigo, linfadenopatía, y reacciones oculares, así como, en raras ocasiones, hipotensión postural (Zea-Flores *et al.*, 1992).

La evidencia más convincente acerca del impacto de la ivermectina sobre la transmisión procede de los estudios hechos en Guatemala, donde se demostró la reducción en el potencial de transmisión en ciertas localidades, y en Ecuador donde se demostró interrupción de la transmisión. Estos estudios indican que si la cobertura de la población es alta, el tratamiento se distribuye dos veces por año; el área tratada es grande y, el vector es relativamente poco eficiente (ej. *S. ochraceum* en Guatemala y *S. quadrivittatum* en Ecuador), entonces la ivermectina puede reducir la transmisión efectivamente (Collins *et al.*, 1992; Cupp *et al.*, 1992; Guderian *et al.*, 1997)

## **2.7 Diagnóstico de la oncocercosis**

### **2.7.1 Diagnóstico parasitológico**

El método de diagnóstico parasitológico consiste en la identificación del agente etiológico de la enfermedad mediante una biopsia superficial de piel. Esto permite cuantificar la intensidad de la infección por microfilarias de *O. volvulus* en miligramos de piel en una población (mfs/mg). Generalmente, el número de biopsias a tomar de un individuo son seis en los lugares anatómicos adecuados, los cuales son escápulas, regiones glúteas, y deltoideos. En las áreas oncocercosas de México, la biopsia de piel presenta una especificidad del 100%, puesto que no co-existe ninguna otra especie de filaria que infecte al huésped humano. Se ha reportado que la biopsia de piel tiene una sensibilidad de 91.6% si se toma un número de seis biopsias en la región de las escápulas, glúteos y piernas (Taylor *et al.*, 1999).

La biopsia de piel ha sido utilizada para monitorear el efecto del tratamiento de ivermectina sobre la prevalencia e intensidad de infección por microfilarias; sin embargo, a medida que las cargas (o intensidad de infección) de microfilarias en los individuos disminuyen debido a la acción de fármaco, la sensibilidad de la biopsia también decrece, puesto que se está eliminando el indicador de infección; además, esta prueba es invasiva, por lo que, en ocasiones, no es aceptada por la población, especialmente si se desea practicar en niños (Schlié-Guzmán y Rivas-Alcalá, 1988).

### **2.7.2 Diagnóstico inmunológico**

Los métodos inmunológicos utilizados para el diagnóstico de oncocercosis se basan en la reacción entre los anticuerpos presentes en la sangre de los individuos y un antígeno especialmente preparado a partir de *O. volvulus*. Entre estos métodos se encuentran la intradermorreacción, prueba de fijación de complemento, prueba de anticuerpos inmunofluorescentes, prueba de hemaglutinación indirecta, prueba de doble difusión, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y difusión en gel ensayo de anticuerpos ligados a enzimas (DIG-ELISA) (Rodríguez Pérez y Rodríguez López, 1994)

### **2.7.3 Diagnóstico molecular**

En los últimos años, se ha desarrollado en Inglaterra, Alemania, Estados Unidos y en el Programa de control de la Oncocercosis (PCO) en África, métodos más sensibles y específicos basados en la detección del ADN de *O. volvulus* tanto en humanos como en simúlidos. Las investigaciones en el desarrollo de sondas de ADN para detectar *O. volvulus* iniciaron a mediados de los años 80's. Con el surgimiento de las pruebas moleculares se han logrado establecer técnicas específicas para la detección de ADN de *O. volvulus* (Meredith *et al.*, 1989), una de ellas para la detección de la variante de la selva (Erttmann *et al.*, 1987) y otra para la variante de la sabana (Erttmann *et al.*, 1990).

Estas técnicas moleculares que utilizan sondas de ADN para la detección del parásito que produce oncocercosis originaron dos líneas de investigación; la primera relacionada con el conocimiento de la secuencia del genoma del parásito que permitió determinar, en base a diferencias o similitudes (distancias genéticas) la

existencia de las diferentes variantes del parásito. Estas variantes se distribuyen en el oeste del África en donde coexisten dos cepas del parásito, tanto en la región de la sabana como de la selva. La segunda línea de investigación permitió utilizar esta técnica molecular de PCR para detectar el parásito dentro del insecto vector. Con esta técnica se pueden procesar cientos de insectos en el laboratorio con el objeto de estimar, de manera precisa y específica, la tasa de infección parasitaria.

La prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del ADN genómico del parásito marcó una nueva pauta para la implementación de técnicas diagnósticas altamente sensibles y específicas. Con esta tecnología es posible estimar la tasa de infección parasitaria y de infectividad en las poblaciones del insecto vector y, por lo tanto evaluar el impacto de las medidas de control que se aplican en diversas regiones afectadas por oncocercosis (Davies *et al.*, 1998; Maia-Herzog *et al.*, 1999). El uso de PCR constituye una herramienta valiosa en el diagnóstico de la oncocercosis, detectando el parásito en los simúlidos.

### 3. ANTECEDENTES

Ortega y Oliver (1984), en coordinación con el Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (CIES, ahora El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR) llevaron a cabo estudios en dos comunidades hiperendémicas del foco sur de Chiapas (Las Golondrinas y Rosario Zacatonal, ambas del municipio de Acacoyagua) sobre captura de simúlidos, empleando la técnica del cebo humano. Los resultados que obtuvieron fueron: en la comunidad de Rosario Zacatonal, *Simulium ochraceum* se capturó en mayor porcentaje en el centro de la comunidad (57.1 %) que en los sitios de cultivo de café y maíz; *S. metallicum* se capturó en mayor porcentaje en los sitios de cultivo de maíz y frijol (52.7 %); mientras que el mayor porcentaje de captura *S. callidum* se obtuvo en el centro de la comunidad. En la comunidad Las Golondrinas, *Simulium ochraceum* siguió un patrón de distribución de mordedura similar al de Rosario Zacatonal.

En estudios epidemiológicos realizados en San Vicente Pacaya, empleando una sola biopsia de piel, se examinaron 2,153 habitantes de los cuales 664 (30,8%) resultaron positivos. Se determinó que la altitud desempeña un papel importante en la parasitosis y se estimó que la transmisión ocurre principalmente entre los 600 y 1 300 m sobre el nivel del mar. De 1,217 personas examinadas por biopsias y palpación de nódulos al mismo tiempo, 587 resultaron positivas por uno o ambos métodos y se detectaron 101 oncocercomas, casi siempre en niños o personas que habían vivido en áreas de baja endemicidad. Se concluyó que ambos métodos se deben aplicar para determinar la adecuada prevalencia de la enfermedad en Guatemala (Ramírez Pérez, 1985)

En la búsqueda de nuevas pruebas inmunológicas para diagnóstico de oncocercosis Bartlett y colaboradores (1975) utilizaron extractos crudos de *O. volvulus* para realizar la ELISA; sin embargo, la prueba produjo valores altos en sueros negativos. Esto se atribuyó a la contaminación con anticuerpos humanos que causaron reacción cruzada con el anticuerpo secundario. La especificidad de los antígenos se mejoró mediante el fraccionamiento del extracto crudo del parásito para eliminar contaminantes. Con la finalidad de aumentar la especificidad y sensibilidad de las pruebas Philipp y colaboradores (1984) reportaron el uso del primer antígeno recombinante purificado para el serodiagnóstico de *O. volvulus*. El antígeno tuvo un tamaño de 20 KDa (Kilodaltones) y se observó en la superficie del

gusano adulto. La prueba con este antígeno se evaluó con sueros de individuos portadores de anticuerpos de varias especies de filarias en diferentes áreas geográficas. La sensibilidad de la prueba en México fue 82%. Cabrera y Parkhouse (1986) separaron antígenos específicos de extractos de *O. volvulus* y *O. gibsoni* en un medio enriquecido con amortiguador salino de fosfato. Estos antígenos fueron fijados a los anticuerpos de sueros de personas con oncocercosis y con otras infecciones filáricas mediante inmunoblot de SDS-PAGE. Los resultados mostraron que las fracciones de antígenos de bajo peso molecular eran más específicas y convenientes para usarse en el sistema ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima).

Posteriormente, Lobos y Weiss (1986) demostraron que estos antígenos cayeron en el rango de 20 a 40 KDa y fueron específicos para oncocercosis y confirmaron, mediante el uso de radiomarcadores, que estos antígenos de *O. volvulus* no producían reacciones cruzadas con otras infecciones similares. Lucius y colaboradores (1988) obtuvieron anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos de 33 y 20 KDa que fueron reconocidos por suero oncocercoso, determinando que el antígeno de 20 KDa era un subproducto de Ov33 y el antígeno nativo fue localizado en el órgano reproductivo de los gusanos adultos.

Bradley y su grupo de investigación (1998) plantearon que la ELISA con OvMBP10, OvMBP11 y OvMBP29 puede ser útil para estimar el grado de endemicidad de las comunidades si se utiliza un índice serológico (IS). Los investigadores observaron diferencias significativas en el IS de los grupos más jóvenes con relación a los más viejos, por lo que sugirieron utilizar el grupo de edad de entre cinco y 15 años como grupo centinela. La ELISA se podría utilizar para valorar la seroprevalencia y el IS en estudios epidemiológicos de tipo transversal. Asimismo, la ELISA se podría utilizar para estimar la incidencia de exposición al parásito en estudios epidemiológicos de tipo longitudinal. La ELISA también funcionó con anticuerpos obtenidos de sangre capilar en papel filtro (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1999), así la toma de la muestra es menos invasiva que la toma de sangre venosa. La biopsia de piel es una prueba invasiva que, en la mayoría de los casos, es rechazada por la población joven. El IS de una población joven centinela produjo rangos de endemicidad entre las comunidades, así este podría ser un buen indicador si se desea evaluar el impacto de un programa de control sobre el cambio

en la tasa de exposición al parásito y, por lo tanto, en la intensidad de transmisión ó de endemicidad.

La evaluación del efecto de la intervención por medio el uso de ivermectina sobre la transmisión de *O. volvulus* pueden realizarse mediante la estimación de la tasa de prevalencia e incidencia en los niños menores a cinco años en áreas hiperendémicas (estudios epidemiológicos) ó mediante la estimación de la tasa de transmisión del parásito por los simúlidos (estudios entomológicos). El ensayo de PCR con sondas de ADN se ha vuelto un método muy útil en la detección del parásito. Debido a que este método puede detectar cualquier forma del parásito y de cualquier estadio de su ciclo de vida, su aplicación ha sido muy útil en el monitoreo de la infección, tanto en la población del humano como en la del insecto vector (Unnasch y Meredith, 1996). Oskam y colaboradores (1996), empleando el método de PCR con oligonucleótidos específicos de *O. volvulus* determinaron la sensibilidad de estos iniciadores al amplificar ADN de una sola larva o microfilaria en poblaciones de *S. ochraceum* y *S. metallicum*. Las muestras de simúlidos las obtuvieron de áreas endémicas del Departamento de Suchitepéquez, Guatemala. Estos simúlidos fueron infectados al alimentarlos con sangre de individuos positivos o al inyectarles una cantidad determinada de microfilarias en el tórax del insecto; los simúlidos no infectados se obtuvieron a partir de la colecta de pupas y posterior emergencia como adulto bajo condiciones de insectario. Los resultados con respecto al número de simúlidos que puede contener cada conjunto para la PCR y amplificar el ADN del parásito fueron: a) cuando infectaron por inoculación intratorácica una cantidad conocida de parásitos, un simúlido infectado con microfilarias en un conjunto de 19 simúlidos no infectados y b) cuando infectaron simúlidos por alimentación sanguínea de un individuo oncocercoso, un simúlido infectado en un conjunto de 79 simúlidos no infectados.

En 1995, Katholi y colaboradores desarrollaron un algoritmo matemático para determinar la prevalencia de infección de *Onchocerca volvulus* en los simúlidos. El método se basa en el número de conjuntos de simúlidos investigados, el tamaño de muestra por cada conjunto de simúlidos y el número de conjuntos positivos y negativos. Para determinar el tamaño de los conjuntos, ellos realizaron un estudio para establecer el límite de detección de la prueba, el cual fue de un simúlido infectado naturalmente en cada conjunto de 100 simúlidos no infectados.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En México se realizan evaluaciones epidemiológicas a profundidad (EEP) periódicamente, en seis comunidades del foco Sur de Chiapas y cuatro del foco Oaxaca, denominadas comunidades centinela. También se han realizado estas evaluaciones en dos comunidades del foco Norte para evaluar la eficacia del control en dicha zona. Las EEP consisten en estudios entomológicos, en los que se realiza la recolecta de *S. ochraceum s.l* y se buscan moscas infectadas con el parásito; también se realiza la evaluación serológica, en busca de anticuerpos contra *O. volvulus*, para determinar la exposición al parásito. Así como exámenes oculares y en piel, en busca de lesiones y microfilarias. Las últimas evaluaciones entomológicas en el foco Chamula y Oaxaca sugieren que la transmisión ha sido suprimida, ya que no se han encontrado personas infectadas, la tasa de exposición es de cero y no se han encontrado moscas infectadas con el parásito.

En el foco Soconusco, los resultados entomológicos sugieren que la transmisión esta suprimida en algunas comunidades; sin embargo, existen ciertas comunidades “problema” en las que aún se encuentra una prevalencia significativa de anticuerpos anti-*O. volvulus* en niños que nacieron después de iniciado el tratamiento con ivermectina. Además según resultados presentados en la última Conferencia Interamericana de Oncocercosis, llevada a cabo en Noviembre del 2007, revelan que aún existen personas con nódulos en el foco Soconusco en aproximadamente 27 comunidades, todas ellas cercanas geográficamente.

La última evaluación entomológica realizada en dos comunidades del foco Soconusco, con cuatro rondas de ivermectina por año, dio una tasa de infección e infectividad de cero; sin embargo, la evaluación serológica mostró tasas de exposición superior al 10% en algunas comunidades. Por tal motivo, nos preguntamos, ¿cómo puede haber serología positiva en niños, sin la presencia de microfilarias en el vector principal? Por esta razón, suponemos que el vector secundario, esta influyendo en el mantenimiento del parásito en dichas comunidades.

Esto podría deberse, a que en México desde 1995 se suministra un régimen semestral de ivermectina y, a partir de 2003 es cuatrimestral en el Soconusco. El efecto de la ivermectina es reducir las cargas de microfilarias de la piel a niveles inferiores de los necesarios para una transmisión eficaz por los vectores. Debido a

este programa de control, las densidades de microfilarias en piel han disminuido notablemente, favoreciendo de esta manera a los vectores que exhiben una mayor infectividad a cargas bajas de microfilarias como lo es *S. metallicum*. La importancia de esto radica, en que OEPA planea dar por terminado el programa de control de la oncocercosis en América en el año 2012, por lo cual es importante saber si el vector secundario esta actuando como reservorio de microfilarias; de ser así, podría haber un resurgimiento de la enfermedad.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Estimar los niveles de infección de *Onchocerca volvulus* en *Simulium metallicum* en comunidades del foco Sur de Chiapas.

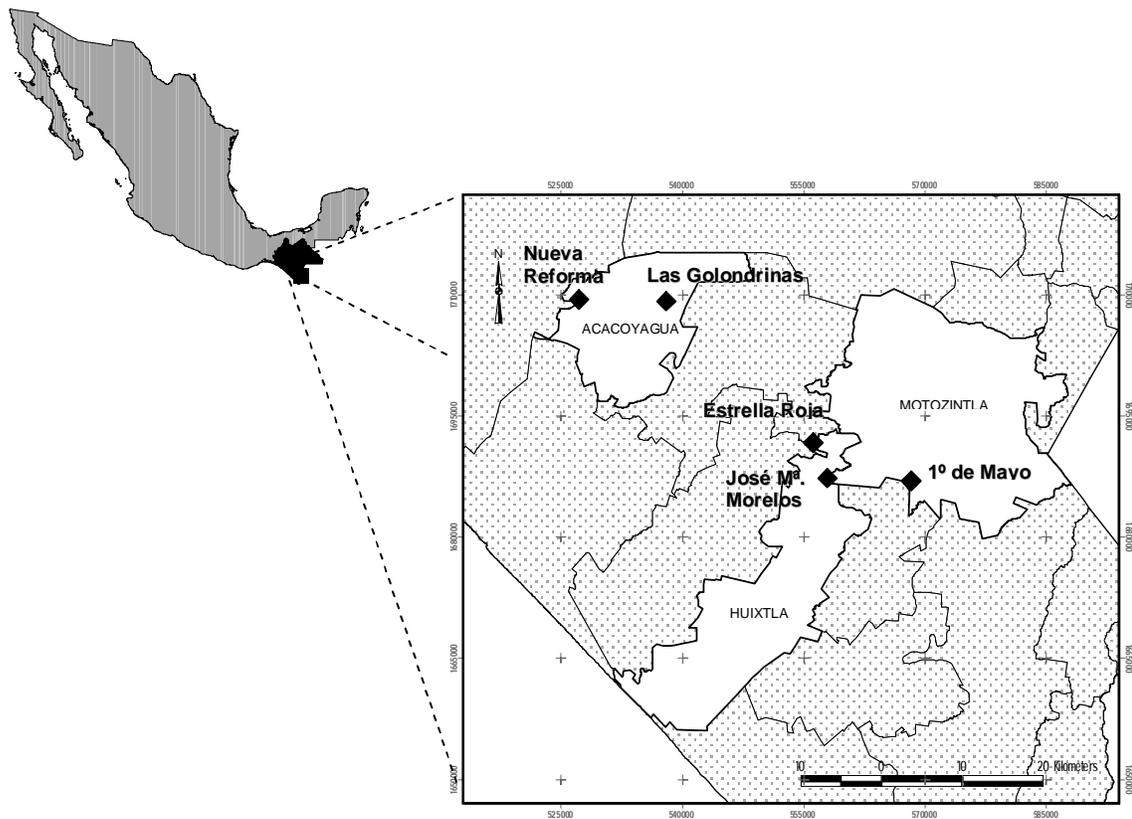
### 5.2 Objetivos específicos

1. Detectar la presencia de *O. volvulus* en *S. metallicum*
2. Determinar la tasa de infección de *O. volvulus* en *S. metallicum*
3. Determinar la tasa de infectividad de *O. volvulus* en *S. metallicum*
4. Estimar el potencial de transmisión de *O. volvulus* por el vector secundario *S. metallicum*

## 6. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 6.1 Área de estudio

Se eligieron cinco comunidades del foco Sur de Chiapas (Soconusco): José María Morelos ( $92^{\circ}27'58''$  N,  $15^{\circ}14'03''$  O; Huixtla), Colonia Primero de Mayo ( $92^{\circ}18'04''$  N,  $15^{\circ}14'31''$  O; Motozintla), Estrella Roja ( $92^{\circ}28'56''$  N,  $15^{\circ}16'30''$  O; Huixtla), Nueva Reforma Agraria ( $92^{\circ}45'04''$  N,  $15^{\circ}26'04''$  O Acacoyagua) y Las Golondrinas ( $92^{\circ}26'38''$  N,  $15^{\circ}26'06''$  O; Acacoyagua). De las cuales, Morelos, Primero de Mayo, Estrella Roja y Nueva Reforma son comunidades centinela; mientras que Las Golondrinas es una comunidad extracentinela.



**Figura 8. Área de estudio.** Ubicación de las comunidades analizadas en este trabajo. En el mapa se muestran los municipios de Huixtla, Acacoyagua y Motozintla.

## **6.2 Captura de adultos de *Simulium* spp**

Los simúlidos fueron recolectados siguiendo procedimientos descritos (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1995, 1999, Rodríguez-Pérez y Rodríguez -López, 1994, Rodríguez-Pérez y Reyes-Villanueva, 1994). Con la participación voluntaria de cuatro adultos residentes de la comunidad afectada, un par de ellos (actuando como recolector y atrayente) para cada sitio de recolecta: la aldea y el cafetal, en cada una de las comunidades durante la época de transmisión del parásito de febrero a mayo del 2001. La recolecta se llevó a cabo durante los primeros 50 minutos de cada hora, iniciando a las 07:00 horas y finalizando a las 16:50 horas, dado que la población hematófaga tiene una proporción mayor de simúlidos hembra paras (hembras que ya hayan ingerido una ración de sangre y que por consiguiente podrían estar infectadas) que muerden durante este horario. Los voluntarios recibieron ivermectina una semana antes de proceder con las capturas. El protocolo de investigación fue aprobado por la comisión de Bioseguridad del Instituto Nacional de Salud Pública.

Los simúlidos capturados se colocaron en diferentes recipientes que se etiquetaron con el nombre de la comunidad, fecha, sitio de captura. Se diseñó un formato de campo de densidad de simúlidos colectados por hora-luz, en el cual se fueron registrando los datos. Los simúlidos fueron conservados en alcohol isopropílico absoluto y se almacenaron a 4 °C, posteriormente fueron separados por especie en el laboratorio y, los *S. metallicum s.l.* que se encontraron con sangre en estómago, fueron desechados.

## **6.3 Separación de cabezas y cuerpos de *S. metallicum s.l.* recolectados.**

Los ejemplares de *S. metallicum s.l.* fueron divididos en grupos de 50 ejemplares cada uno, el isopropanol se eliminó, mediante el lavado por tres tiempos en etanol al 95% y se dejaron secar. Los simúlidos secos fueron transferidos a un tubo para criopreservación de 2 mL. En un tubo de 50 mL. Se introdujeron a presión cinco de los tubos para criopreservación y se colocó en nitrógeno líquido por 30 min. Posteriormente, el tubo fue abierto para liberar la presión ejercida por la baja temperatura. Los tubos se agitaron, de manera vigorosa y, se golpearon sobre un cojinete de computadora o contra una superficie de cemento para separar las

cabezas de los cuerpos. Las cabezas se aislaron de los cuerpos mediante su paso por un tamiz de 0.25 mm. Las cabezas y cuerpos aislados fueron separados en tubos de microcentrifugación de 1.5 mL y procesados de manera independiente (Guevara *et al.*, 2003).

#### **6.4 Extracción y Purificación de ADN.**

Se hicieron grupos de 18 muestras; en paralelo al ensayo de cada grupo de muestras, se realizaron dos “falsas” extracciones de ADN como controles del proceso (es decir, se llevó a cabo el proceso de extracción pero sin contener los simúlidos) que sirvieron como control negativo interno. Los grupos de cabezas y cuerpos de los simúlidos fueron macerados de manera independiente y se obtuvo una solución homogenizada con el uso de los siguientes químicos: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 400 µg/mL de proteinasa K y 250 ng/µl de ADN de esperma de salmón. Para digerir las proteínas con la proteasa en el homogenizado, éste fue incubado a 55 °C por una hora. El homogenizado fue incubado a 100 °C por 30 minutos en presencia de 1mM DTT (dithiothreitol) para romper la cutícula del parásito, seguido de una serie de pasos de congelamiento y deshielo para liberar el ADN del parásito. Se realizó la purificación de ADN del parásito con fenol-cloroformo (1/1 v/v) en dos ocasiones, seguida de una extracción con cloroformo. A la capa acuosa de la extracción final se le añadieron tres volúmenes de solución de NaI y posteriormente se incubó a 4 °C por 15 minutos. La solución fue transferida a una placa con pozo de microfiltración (Whatman GF/B), en esta placa se realizó el lavado del ADN con dos rondas de absorción. El ADN fue diluido de la placa de microfiltración con un volumen final de 50 µL de agua miliQ estéril mantenida a 55 °C, y el extracto final almacenado a -20 °C para su uso posterior (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004).

#### **6.5 Amplificación por PCR.**

Las reacciones de amplificación de ADN por PCR se llevaron a cabo en grupos de 84 muestras, en las hileras B-H de una placa de microtitulación (Figura 9). En la amplificación se utilizó como molde para la reacción de PCR, 2.5 µL del preparado de ADN purificado dentro de un volumen total de 50 µL que contuvo una

concentración final de 20  $\mu$ M del iniciador O-150 (5' GATTYTTCCGRCGAANARCGC 3') y 20  $\mu$ M del iniciador O-150 (5' B-GCNRTRTAAATNTGNAAATTC 3', donde N = A, G, C o T; Y = C o T; R = A o G), marcado con biotina para etiquetar el producto de PCR resultante (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). Las condiciones del ensayo de PCR fueron las siguientes: 1) la concentración de solutos en la mezcla de PCR consistió en 300 mM Tris HCl pH 9.0, 75 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM para cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP y 2.5 unidades de polimerasa Taq (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN); y, 2) cada reacción de PCR consistió de 5 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 37 °C y 30 seg a 72 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 37 °C y 30 seg a 72 °C. La reacción se completó por la incubación a 72 °C por 6 min. La hilera A de la placa de microtitulación fue reservada para colocar 10 controles negativos y dos controles positivos.

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 | 1 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |
| C | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |
| D | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |
| E | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |
| F | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |
| G | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |
| H | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ | ☉ |

**Figura 9.** Detección de productos de PCR con la sonda OVS2 por ELISA. La línea A del pozo 1 al 10 corresponden a los controles negativos, el pozo 11 corresponde al control de inhibición, el pozo 12 al control positivo. Los pozos de la línea B-H son para las muestras

Uno de los controles positivos del PCR se utilizó para colocar la cantidad mínima de ADN del parásito (ADN del pOVS134 purificado) que fue detectada de manera consistente de acuerdo a la condición de amplificación en un ensayo de microtitulación. Este control positivo nos aseguró que todas las reacciones en los grupos ensayados estuvieron operando en el pico de mayor eficiencia. El segundo control contuvo la misma cantidad mínima de ADN del parásito mezclado con 1.5  $\mu$ L de un preparado de una muestra que resultó ser negativa en un ensayo anterior.

Con esto controlamos la posibilidad de la presencia de inhibidores de la PCR y, por tanto, de resultados falso negativos.

## **6.6 Detección de productos de PCR por inmunoensayo (ELISA) y su interpretación.**

El procedimiento de ELISA para detectar productos de PCR O-150, descrito por varios autores (Unnasch-Meredith, 1996, Guevara *et al.*, 2003, Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). En resumen, 10% de cada producto de PCR (5  $\mu$ l) se colocó en un pozo de la placa de microtitulación que contuvo estreptavidina (1  $\mu$ g/mL) y Buffer de carbonatos (1/1000 1 X Buffer de carbonatos), incubada durante toda la noche a 4 °C. Los productos de PCR, etiquetados con biotina, pegados en la placa fueron hibridados con una sonda u oligonucleótido específico para *O. volvulus* marcada con fluoresceína (OVS2: 5' AATCTCAAAAACGGGTACATA-FL 3'); la sonda OVS2 con fluoresceína fue detectada con anticuerpo anti-fluoresceína conjugado a fosfatasa alcalina (fragmento FA; Roche Diagnostics). La reacción entre la sonda y el anticuerpo fue revelada usando el estuche de amplificación de sustrato FA de Invitrogen (Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El desarrollo del color de la reacción se detuvo con una solución de ácido sulfúrico (0.3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y las placas se colocaron en una lectora ELISA a 450 nm. En seguida se determinó la media y desviación estándar de la densidad óptica de los 10 controles negativos. El punto de corte de la ELISA fue la media más tres desviaciones estándar, es decir, con  $P < 0.05$ , asumiendo una distribución normal de los valores de densidad óptica. Sin embargo, en varios casos, la lectura de los controles negativos fue arriba de 0.1. En estos casos, se utilizó un punto de corte de 0.2, ya que el verdadero positivo fue siempre mayor que 0.2; de tal manera que, se redujo el número de falsos positivos y se obtuvo ensayos más limpios.

Cualquier muestra problema con una lectura arriba del punto de corte fue considerada, de manera provisional, como muestra positiva; la muestra que dio lectura por debajo del punto de corte fue considerada como muestra negativa. A la muestra provisional positiva se le aplicó, por segunda ocasión, el ensayo de PCR y ELISA. Sólo la muestra problema que resultó ser positiva en dos reacciones independientes de PCR/ELISA fue considerada como verdadera positiva.

## 6.7 Análisis de datos

Para el análisis de los resultados de PCR se seleccionaron tres parámetros: 1) la proporción de infección parasitaria se calculó de la proporción de simúlidos infectados del examen, por PCR, de los cuerpos de los simúlidos; 2) la proporción de infectividad se calculó de la proporción de simúlidos con larvas L3s del examen, por PCR, de cabezas solamente. El programa de algoritmo “Poolscreen”® (cribado de lotes de Katholi *et al.*, 1995) calculó ambas proporciones de infección y el intervalo de confianza (IC) superior e inferior pre-seleccionado (en este estudio fue del 95%). La descripción del modelo de Katholi *et al.*, (1995) se reportó en Davies *et al.*, (1998) y Guevara *et al.*, (2003). En resumen, el algoritmo de Katholi estimó la proporción\_ IC de infección de una muestra poblacional de simúlidos ensayados por PCR a partir de: 1) el número de lotes de simúlidos que resultaron negativos en el PCR; 2) el número de lotes de simúlidos ensayados por PCR; y 3) el tamaño del lote de simúlido, que fue de 50.

El método de Poolscreen ó prueba de grupo está basado en un algoritmo que permite el análisis de grupos de organismos de una misma especie para determinar la proporción de organismos infectados en una población en estudio. Este programa requiere que el número de individuos, en este caso (moscas) utilizadas; sea el mismo en cada grupo. Además se requiere conocer el número total de grupos y el número de grupos negativos analizados por PCR.

La principal suposición en el programa del Poolscreen es que los grupos negativos no contienen ningún individuo infectado. Por lo tanto es necesario que la sensibilidad del ensayo a usar sea lo más cercana al 100%, para evitar los falsos negativos. Por otra parte un grupo positivo por PCR nos indica que al menos una mosca esta infectada con larvas infectivas (L3) de *O. volvulus*. La formula para el cálculo de la prevalencia es:

$$P = \frac{\text{Número de lotes positivos}}{\text{Número de lotes analizados}} \left[ \text{Número de simúlidos por lote} \right]$$

Se utilizó el programa Poolscreen® para calcular la prevalencia de moscas infectivas capturadas en las diferentes comunidades utilizando para ello grupos de 50 cabezas; el intervalo de confianza que estima el programa es del 95%. La proporción de moscas infecciosas (prevalencia de infección en lotes de cabezas) fue usada para estimar el potencial de transmisión estacional, (de aquí en adelante se nombrará sólo como potencial de transmisión, PTA). El potencial de transmisión se calculó como el producto de la tasa de picadura y la proporción de moscas con larvas L3s en la época de transmisión y el promedio de larvas L3s en cada mosca infecciosa, que asumimos era de una L3/mosca. La tasa de picadura estacional se calculó como el producto de la media geométrica de Williams (Williams, 1937) y el número de moscas recolectadas por persona por día y el número de días de la época de transmisión.

El número de moscas capturadas cada 50 minutos fue ajustado a una hora, dividiendo entre 0.83. Un valor constante de uno fue agregado para cada valor ajustado y se calculó la media geométrica del número de moscas por persona, este valor fue multiplicado por 10 (número medio de horas luz durante la época de transmisión en las latitudes muestreadas, Kotz *et al.*, 1988) para obtener un estimado de la tasa de picadura diaria. La tasa de picadura diaria fue, entonces, multiplicada por el total de días de la época de transmisión para obtener la tasa de picadura. Se verificó que la transformación logarítmica cumpliera con la distribución normal usando la prueba de Smirnov Kolmogorov Chicago, utilizando el software SPSS, (SPSS Inc., Chicago, IL) de esa manera se calculó el intervalo de confianza por cada hora. Se determinó el anti-logaritmo de estos intervalos y se restó la constante tanto del límite inferior como del superior (el 95% del intervalo de confianza llegó a ser asimétrico de acuerdo a Kirkwood y Sterne, 2003); tanto la media geométrica como el intervalo de confianza fueron multiplicados por 10 para obtener el intervalo de confianza de la tasa de picadura diaria. Los intervalos de confianza para el PTA fueron el producto de la tasa de picadura y los intervalos de confianza de la tasa de infectividad (Kotz *et al.*, 1998).

Debido a que se recolectaron moscas de *S. metallicum* s.l únicamente durante los meses de máxima transmisión, no fue posible calcular con precisión, a partir de nuestros datos, el potencial de transmisión anual (PTA). En lugar del PTA, se calculó el potencial de transmisión estacional. Sin embargo, es probable que en aquellos meses del año que no corresponden con el período de máxima transmisión

(i.e. de febrero a mayo), no exista transmisión o ésta ocurra a nivel residual o extremadamente bajo. Por lo tanto, el valor estimado del potencial de transmisión estacional estará muy cercano al valor de PTA.

El criterio para definir interrupción de transmisión en áreas donde no hay datos pre-ivermectina se obtuvo del criterio del programa para la eliminación de la oncocercosis en África (APOC) que asume que la supresión de la transmisión se logra cuando existe una tasa de menos de un simúlido en 1,000 moscas paras examinadas. En América Latina, la tasa de paridad de los simúlidos podría estar alrededor del 50%, por lo que se adoptó el criterio de un simúlido con L3s en 2,000 simúlidos examinados, asumiendo que al menos 1,000 son moscas paras. Entonces los valores de prevalencia y límites de confianza arrojados por el algoritmo fueron multiplicados por 2,000 para expresar tanto la tasa de infección parasitaria como la tasa de infectividad (Rodríguez-Pérez, 2005)

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Datos generales del estudio

Se recolectaron un total de 13,750 ejemplares de *Simulium metallicum* en cinco comunidades del foco sur de Chiapas: Estrella Roja (Huixtla), Primero de Mayo (Motozintla), Las Golondrinas (Acacoyagua), Nueva Reforma Agraria (Acacoyagua) y José María Morelos (Huixtla). En la comunidad de Primero de Mayo se recolectó el mayor número de ejemplares, representando el 42.90 % y junto con Nueva Reforma Agraria constituyeron el 73.08 % del total de las muestras capturadas (Cuadro 1). Se formaron un total de 275 lotes de cuerpos y de cabezas (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Número de *S. metallicum* recolectados en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas

| Comunidad                   | No. de moscas | Porcentaje |
|-----------------------------|---------------|------------|
| Estrella Roja               | 2,550         | 18.54      |
| Primero de Mayo             | 5,900         | 42.90      |
| Las Golondrinas             | 150           | 1.09       |
| Nueva Reforma Agraria       | 4,150         | 30.18      |
| José M <sup>a</sup> Morelos | 1,000         | 7.27       |
| <b>Total</b>                | <b>13,750</b> | <b>100</b> |

**Cuadro 2.** Número de lotes formados de *S. metallicum* recolectados en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas

| Comunidad                   | No. de lotes | No. de moscas |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| Estrella Roja               | 51           | 2,550         |
| Primero de Mayo             | 118          | 5,900         |
| Las Golondrinas             | 3            | 150           |
| Nueva Reforma Agraria       | 83           | 4,150         |
| José M <sup>a</sup> Morelos | 20           | 1,000         |
| <b>Total</b>                | <b>275</b>   | <b>13,750</b> |

### 7.2. Estudio entomológico

De los 275 lotes de cuerpos examinados de *S. metallicum*, ocho resultaron positivos, tres procedentes de las comunidades Primero de Mayo y cinco de Nueva Reforma Agraria, con una tasa de infección total de 1.07 (Cuadro 3). La tasa de infección fue mayor en Nueva Reforma Agraria, con valores de 2.72 con un intervalo de confianza de 0.73 – 5.02.

**Cuadro 3.** Prevalencia de infección (expresada en una tasa por 2,000 moscas examinadas) en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas

| Comunidad                   | No. de lotes | No. de moscas | Tasa de infección            |
|-----------------------------|--------------|---------------|------------------------------|
| Estrella Roja               | 51           | 2,550         | <b>0</b><br>(1.49)           |
| Primero de Mayo             | 118          | 5,900         | <b>1.19</b><br>(0.16 – 2.46) |
| Las Golondrinas             | 3            | 150           | <b>0</b><br>(23.34)          |
| Nueva Reforma Agraria       | 83           | 4,150         | <b>2.72</b><br>(0.73 – 5.02) |
| José M <sup>a</sup> Morelos | 20           | 1,000         | <b>0</b><br>(3.78)           |
| <b>Total</b>                | <b>275</b>   | <b>13,750</b> | <b>1.07</b><br>(0.49 – 2.08) |

Los números en negritas representan el valor central y los números entre paréntesis son los intervalos de confianza estadístico al 95%.

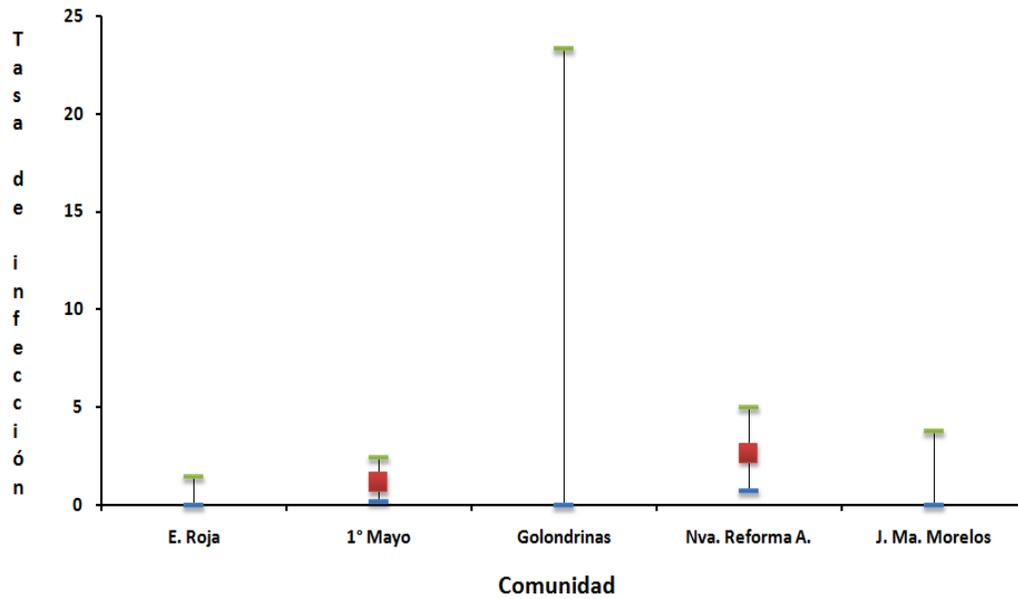
Los datos sugieren evidencia de contacto del vector con el parásito en ambas comunidades, por lo que se realizaron análisis a 201 lotes de cabezas. Únicamente un lote cabezas de la comunidad Primero de Mayo resultó positivo, con la cual se obtuvo una tasa de infectividad de 0.29 con lo cual se satisface el criterio de “ausencia o casi ausencia” de la transmisión de acuerdo al criterio de la OMS, adoptado por OEPA (>1 mosca infecciosa/2,000 moscas examinadas) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Prevalencia de infectividad (expresada en una tasa por 2,000 moscas examinadas) en cinco comunidades del foco Sur de Chiapas

| <b>Comunidad</b>                  | <b>No. de lotes</b> | <b>No. de mosca</b> | <b>Tasa de infectividad</b> |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| <b>Estrella Roja</b>              | 51                  | 2,550               | --<br><b>0.51</b>           |
| <b>Primero de Mayo</b>            | 118                 | 5,900               | (0.0005 – 1.32)             |
| <b>Las Golondrinas</b>            | 3                   | 150                 | --                          |
| <b>Nueva Reforma Agraria</b>      | 83                  | 4,150               | <b>0</b><br>(0-0.92)        |
| <b>José M<sup>a</sup> Morelos</b> | 20                  | 1,000               | --<br><b>0.29</b>           |
| <b>Total</b>                      | <b>275</b>          | <b>13,750</b>       | <b>(0.0003 – 0.77)</b>      |

Los números en negritas representan el valor central y los números entre paréntesis son los intervalos de confianza estadístico al 95%.

La proporción de moscas infectadas fue mayor que la proporción de moscas infectivas y únicamente en las comunidades de Primero de Mayo y Nueva Reforma se obtuvieron valores de tasa de infección de 1.19 (IC 95% 0.16 – 2.46) y 2.72 (IC 95% 0.73 – 5.02) respectivamente (Figura 10).



**Figura 10. Tasa de infección.** Tasa de infección en *S. metallicum*, expresada por cada 2,000 moscas, para comunidades del foco Sur de Chiapas.

Como muestra la Figura 10, no hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ,  $\alpha = 0.05$ ), entre las comunidades; sin embargo, el límite superior en Las Golondrinas es mayor que para el resto de las comunidades por que el número de muestras es menor. No hay diferencia estadística ya que los intervalos de confianza en todas las comunidades están superpuestos.

En cuanto a la tasa de infectividad, Primero de mayo fue la única comunidad donde se encontraron lotes de cabezas positivas a *O. volvulus*, dando una tasa de infectividad de 0.51 (IC 95% 0.0005-1.3). Para el caso de la comunidad Nueva Reforma Agraria, no resultaron cabezas positivas, por lo que la tasa de infectividad fue de cero, y solo se calculó el límite de confianza superior. Para el resto de las comunidades no se calculó, ya que solo se realizó el análisis en lotes de cabeza cuando en la comunidad resultaron lotes de cuerpos positivos.

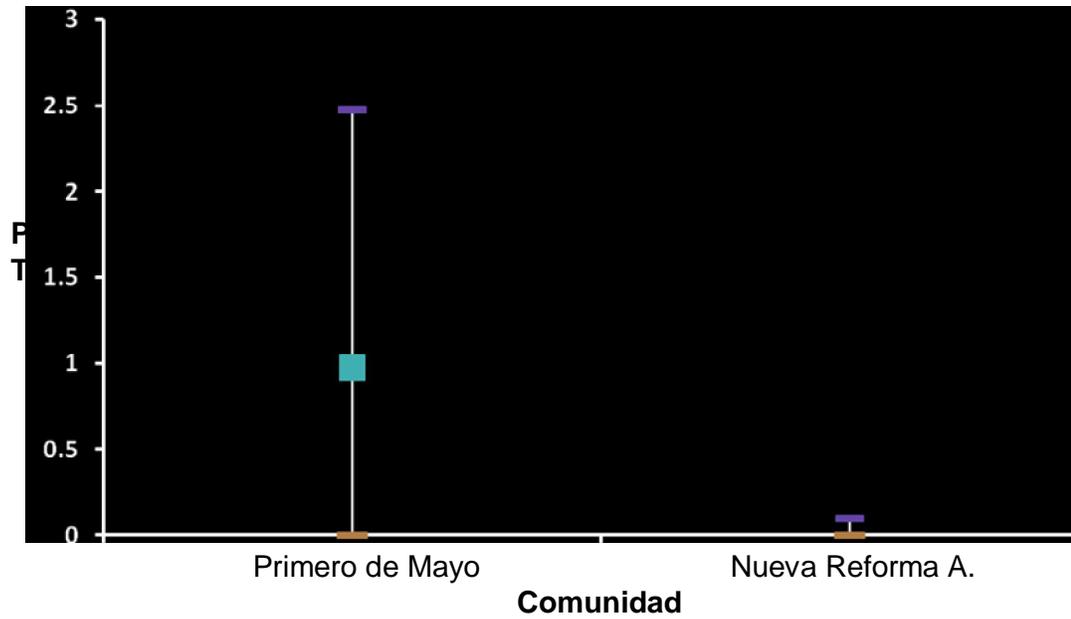
**Cuadro 5.** Tasa de picadura y potencial estacional de transmisión en dos comunidades del foco sur de Chiapas.

| <b>Comunidad</b>      | <b>Tasa de picadura/hombre/estación</b> | <b>Potencial de transmisión</b> |
|-----------------------|---|---------------------------------|
| Primero de Mayo       | 3809.5                                  | <b>0.971</b> (0.001-2.476)      |
| Nueva Reforma Agraria | 2078.7                                  | <b>0</b> (0- 0.096)             |

Los números en negritas representan el valor central y los números entre paréntesis son los intervalos de confianza estadístico al 95% alrededor del valor central

Las moscas fueron colectadas antes de alimentarse. Esta tasa de posamiento fue tomada como estimador de la tasa de picadura. Es posible que la tasa de picadura esta sobre estimada porque una porción de las moscas que se posan no consiguen alimentarse. Debido a que nuestros datos parten de recolectas de moscas de *S. metallicum sensu lato* únicamente durante los meses de máxima transmisión, no fue posible calcular con precisión el potencial de transmisión anual (PTA) (Cuadro 5). En lugar del PTA, se calculó el potencial de transmisión estacional. Sin embargo, es probable que en aquellos meses del año que no corresponden con el período de máxima transmisión (*i.e.* febrero a mayo), no exista transmisión o ésta ocurra a nivel residual ó extremadamente bajo.

Por lo tanto, el valor estimado del potencial de transmisión estacional estará muy cercano al valor de PTA. Se asume que después de múltiples rondas con ivermectina el número de L3s presentes en cada mosca infecciosa podría estar cercano a una L3/mosca. Solamente se calculó el Potencial de transmisión de Primero de Mayo y Nueva Reforma Agraria (Cuadro 5) ya que fueron las únicas comunidades en las que se analizaron lotes de cabezas. Los resultados, no ofrecen diferencia estadística significativa entres estas dos comunidades  $P > 0.05$ ,  $\alpha = 0.05\%$ ; figura 11).



**Figura 11. Potencial de transmisión.** PT de las dos comunidades con lotes de cabezas positivos (L3/persona/estación).

En la comunidad Primero de Mayo el PT calculado fue de 0.97L3/persona, mientras en Nueva Reforma Agraria, debido a que no se encontraron moscas infectivas, el PT calculado fue de cero.

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo es la primera investigación realizada sobre *Simulium metallicum* en México, como parte del monitoreo sobre el impacto del programa de tratamiento con ivermectina en los parámetros epidemiológicos de la oncocercosis en algunas comunidades del foco sur de Chiapas. Los resultados de este tipo de investigaciones son de gran relevancia para la Secretaría de Salud de México, ya que informan del estado de la transmisión a partir de un programa basado en el uso de un solo medicamento, pero con una alta tasa de cobertura.

Los datos aquí mostrados, son igualmente importantes para la iniciativa regional para la eliminación de la oncocercosis (OEPA) y, para la Organización Mundial de la Salud, puesto que México se perfila como uno de los primeros países donde es posible documentar el estado de interrupción de la transmisión del parásito por *S. ochraceum*. Por ello, es importante evaluar el estado de la transmisión por *S. metallicum* ya que este es el vector secundario en México. Actualmente si tiene la certeza de que la transmisión en los focos Oaxaca y Norte de Chiapas ha sido interrumpida (Rodríguez-Pérez, comunicación personal). Sin embargo, para el foco Sur de Chiapas en el 2009 se está realizando una Evaluación Epidemiológica a Profundidad (EEP) que permita documentar el estado de transmisión actual; esta EEP no incluye el análisis de los vectores secundarios de la enfermedad en México. Por lo tanto, es importante tener información entomológica de dichos vectores.

La presencia de infección transmitida por *O. volvulus* en humanos puede determinarse mediante métodos moleculares, inmunológicos o por búsqueda de microfilarias en biopsia de piel. Para la detección del parásito en el vector, la forma tradicional es la disección. Aunque actualmente la búsqueda de ADN del parásito, por medio de la PCR con sondas específicas para *O. volvulus*, es el método más usado y más específico y su aplicación ha sido muy útil en el monitoreo de la transmisión. Por ello, en el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR-ELISA, para la detección del ADN del parásito debido a que este método puede detectar cualquier estadio de su ciclo de vida.

De la misma manera que en este estudio, la técnica de PCR ELISA ha sido utilizada para el monitoreo de la transmisión por *S. metallicum* en otros países. Este trabajo siguió los mismos procedimientos que el realizado por Fernández y

colaboradores (2008). Al igual que en México y Venezuela, investigadores de Brasil y Guatemala han utilizado esta misma metodología para el monitoreo de la transmisión (Marchón-Silva *et al.*, 2007; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004; Lindblade *et al.*, 2007). En estos países los grupos de trabajo han contribuido al monitoreo de la transmisión después de la aplicación del tratamiento para cumplir con el programa de la OEPA, habiéndose declarado ya varias comunidades libre de transmisión.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante la técnica PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para la identificación de *O. volvulus*, muestran que en una de las cinco comunidades analizadas, se encontraron ejemplares de *S. metallicum* s.l. infectados con larvas de *O. volvulus* en estadio L3. La asociación de *O. volvulus* con *S. metallicum*, también se ha registrado en los focos de Guatemala (De León, 1947), Venezuela (Peñalver, 1961) y Colombia (Ramírez-Pérez, 1985).

En México la transmisión de *O. volvulus* se asigna a *S. ochraceum*. Sin embargo, nuestros resultados revelan la presencia de *S. metallicum*, como vector secundario en el foco sur de Chiapas. Debido a que *S. metallicum*, no cuenta con una armadura cibarial, es mejor vector a bajas densidades de microfilarias. Las hembras de *S. metallicum* tienen hábitos hematofágicos y, la presencia de un aparato bucal especializado en lacerar la piel y romper los vasos capilares a la hora de obtener una comida sanguínea, los hace particularmente adaptados a la ingestión de las microfilarias de *O. volvulus* presentes en la piel o dermis. La sangre de animales vertebrados de sangre caliente (mamíferos y aves) es un recurso necesario para estos insectos para el desarrollo de sus huevos.

Contrario a lo que sucede con *S. metallicum*, en *S. ochraceum* s.l. es se presenta una armadura bucofaríngea con dientecillos, que destruye las microfilarias de piel durante su paso hacia el intestino medio o “estómago” del simúlido. Por lo tanto, *S. ochraceum* s.l. requiere alimentarse de individuos con altas cargas de microfilarias de piel para que puedan desarrollarse las larvas L3s (Collins *et al.*, 1995). Por lo anterior, se deduce que *S. metallicum* es un vector más eficiente a baja densidad de microfilarias, ya que no cuenta con una armadura cibarial como la de *S. ochraceum*. Las especies de simúlidos vectores que carecen de esta estructura tienden a desarrollar una mayor proporción de larvas infectivas de *O. volvulus* en relación a la ingesta de microfilarias, lo cual les confiere una relativa mayor eficiencia vectorial a bajas densidades de microfilarias. La relevancia de las

cargas microfilaricas estriba en que, en el contexto de programas de control con ivermectina, dichas densidades disminuirán notablemente en piel, favoreciendo a aquellas especies de vectores que exhiban una mayor infectividad, por carga de microfilarias (Basáñez *et al.*, 1995). Por ello es importante analizar este tipo de vectores para tener un panorama más real de la transmisión de *O. volvulus*.

La presencia o ausencia de la armadura cibarial no es el único determinante de la competencia vectorial entre las especies de simúlidos, influyen otros factores, tales como la matriz peritrófica, que rodea la comida sanguínea y precede a la digestión de la sangre (Reid y Lehane 1984), y la capacidad innata o adquirida por parte del insecto de defenderse inmunológicamente frente a la agresión representada por el parásito (Ham, 1992). Además de la adquisición de cierta inmunidad por parte de los simúlidos (en la cual posiblemente intervienen lectinas, hemocitos, y componentes humorales de la hemolinfa, entre otros), los simúlidos pueden ser naturalmente refractarios al desarrollo larvario de *O. volvulus* (Basáñez *et al.*, 1995).

En cuanto a la tasa de infección e infectividad de *S. metallicum* en las cinco comunidades analizadas no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, cuando comparamos nuestros resultados con un estudio previo de Rodríguez-Pérez (2004), realizado con *S. ochraceum* en el mismo año de captura utilizando el mismo método, si existen diferencias en lo que respecta a la tasa de infectividad y potencial de transmisión entre *S. metallicum* (0.51 y 0.97 L3/persona) y *S. ochraceum* (0.0), en la comunidad Primero de Mayo. Esto nos indica que en esta comunidad, *S. metallicum* podría estar actuando como reservorio de microfilarias y manteniendo la transmisión de *O. volvulus*.

En la comunidad de Las Golondrinas se observó que, después de 15 años de tratamiento con ivermectina, se ha logrado una reducción de la transmisión mayor al 99% si se compara con el potencial estacional de transmisión que era de 19.5% L3s/persona/año antes de iniciado el tratamiento (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006). Por lo tanto, estos datos cumplen con el criterio propuesto por la OMS de “ausencia o casi ausencia” de la transmisión en áreas donde existen datos pre-tratamiento. En este trabajo, en la comunidad de las Golondrinas resultó una tasa de infectividad e infección de cero.

En el foco Norte de Chiapas, Rodríguez-Pérez y colaboradores (2006) reportaron, que de los lotes analizados ninguno resultó positivo a la prueba de PCR,

lo que indica que no hay evidencia de contacto entre el parásito y el vector. En la reunión llevada a cabo por el Comité Coordinador del Programa, en noviembre 2007, previo a la XVII IACO, se emitió recomendaciones de suspender el tratamiento del foco Norte de Chiapas, México, luego de comprobarse que los indicadores epidemiológicos habían alcanzado los umbrales que indican la suspensión de la transmisión (OEPA, 2008). Por ello se espera que en poco tiempo se tengan los mismos resultados para el foco Soconusco y México reporte interrupción de la transmisión en sus tres focos oncocercosos.

Clásicamente la detección de *O. volvulus* en el vector se ha llevado a cabo mediante la disección manual de las moscas de la especie involucrada en la transmisión de la oncocercosis. Sin embargo, con el uso de la ivermectina, y la consecuente disminución de la infección (Guevara *et al.*, 2003), la disección de moscas es poco eficiente para realizar evaluaciones epidemiológicas a profundidad, sobre todo en América donde las tasas de infección son bajas y después del tratamiento masivo con ivermectina, por lo que haría falta la disección de un gran número de moscas para obtener resultados estadísticamente significativos (Oskam *et al.*, 1996). Desafortunadamente, no se tienen datos de seguimiento después de iniciado el tratamiento con ivermectina en el vector secundario *S. metallicum*; sin embargo, los resultados de nuestra investigación sugieren que ivermectina redujo la presencia de *O. volvulus* en *S. metallicum*, similar a lo que se documenta para *S. ochraceum* después de tratamientos sucesivos.

Si bien la transmisión parece estar suprimida en algunas comunidades, debido al tratamiento con ivermectina, esta supresión no significa que se haya logrado una interrupción permanente de la transmisión. Por lo tanto, es necesario mantener las actividades de control hasta que el nivel de transmisión sea tan bajo que no ocurra retorno; el cual se podría presentar si se suspende el tratamiento y aún no se ha alcanzado que la tasa de transmisión esté por debajo del “umbral”. Desafortunadamente, es difícil de predecir hasta qué grado o período de tiempo la transmisión puede resurgir una vez suspendida la actividad de control. Como se sabe, *S. ochraceum* es poco competente a bajas densidades de microfilarias en piel, lo que podría dificultar la resurgencia de la transmisión (Duerr *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007). Sin embargo, vectores como *S. metallicum* son eficientes bajo estas condiciones y por ello es importante realizar estudios en este vector en áreas donde se propone suspender el tratamiento.

El Programa de Control de la Oncocercosis en México inició la aplicación de la ivermectina a nivel masivo en 1989. La ivermectina es un medicamento que elimina las microfilarias, es seguro y tolerable en los humanos, ya que provoca escasas reacciones colaterales que son fácilmente manejables. La ivermectina no elimina a los gusanos adultos, pero detiene el desarrollo larvario de las microfilarias. La incapacidad de la ivermectina para eliminar a los gusanos adultos, junto con el hecho de que las infecciones de oncocercosis son múltiples y acumulativas y, en algunos individuos asintomáticas, son unos de los problemas asociados con el control y eliminación de la enfermedad (Rodríguez-Pérez, 2005). En México, las primeras rondas de tratamiento semestral con ivermectina redujeron las manifestaciones clínicas de la oncocercosis, pero tuvieron poco efecto sobre la transmisión del parásito, a pesar de un alto porcentaje de cobertura en la población elegible. Por lo tanto, se concluyó que en México, así como en otros países endémicos, la supresión e interrupción de la transmisión del parásito sólo sería posible mediante el sostenimiento del programa con ivermectina a largo plazo (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1995).

Aunque en este estudio no se obtuvo un Potencial de transmisión que esté por encima del criterio de la OMS en la comunidad Primero de Mayo, es importante recalcar esta diferencia, ya que en esta comunidad OEPA reportó niños con anticuerpos anti-*O. volvulus* y personas portadoras de nódulos. En la Conferencia Interamericana sobre Oncocercosis 2007 se dio a conocer, que durante el periodo 2003-2006 se encontraron 20 comunidades con presencia de nódulos, entre ellas se encuentran las analizadas en este estudio que son: Nueva Reforma Agraria, Las Golondrinas, José María Morelos, Primero de Mayo y Estrella Roja. Como ya se mencionó, es importante aumentar el número de lotes de *S. metallicum* analizados. Con los resultados obtenidos, es posible pensar que *S. metallicum* podría llegar a ser el responsable de mantener la transmisión de oncocercosis en estas comunidades (IACO, 2007).

Los investigadores de OEPA sugieren que un potencial de transmisión entre 5 y 20 L3s/persona/año (WHO, 2001) podría representar el "umbral" de transmisión por debajo del cual la población ya no sobrevive. Por lo tanto, por debajo de éste valor, la población del parásito podría difícilmente auto-sustentarse, conduciendo a la extinción del parásito aún y cuando se suspendieran las medidas de control. Este valor de PTA, es el que se sugiere sea referido como umbral por debajo del cual la

transmisión está interrumpida. Tanto en Primero de Mayo como en Nueva Reforma Agraria, el valor del PTA se encuentra por debajo de este umbral; sin embargo, se requiere un mayor número de *S. metallicum* de estas comunidades para poder asegurar que la transmisión ha sido suprimida. En las otras tres comunidades no se determinó el PTA ya que no se analizaron los lotes de cabezas por no resultar cuerpos positivos.

La intensidad de la transmisión de la oncocercosis se relaciona de manera directa con: la proporción de insectos hembra que sobreviven y son capaces de desarrollar el estadio infectante para los humanos (larvas L3) después de haber ingerido microfilarias; el número de larvas L3 producidas por cada mosca infectante y, la densidad de picadura sobre los humanos. Todos estos factores en conjunto, además de la distribución espacial de la especie, determinan en gran parte el nivel de endemicidad de la enfermedad en un área determinada. Finalmente, es importante mencionar, que el foco Sur sigue siendo un problema por lo que es preciso seguir con las EEP y se sugiere con estos resultados, que se analicen especímenes de *S. metallicum* con la finalidad de tener un panorama más real y además aumentar el número de comunidades analizadas.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se detectó la presencia de ADN de *O. volvulus* en *S. metallicum* en las comunidades Primero de Mayo y Nueva Reforma Agraria.
2. La tasa de infección general fue de 1.07 L3/ persona, demostrando que se estableció contacto entre el vector *S. metallicum* y el parásito en las comunidades de Primero de Mayo y Nueva Reforma Agraria.
3. La tasa de infectividad general fue de 0.29 L3/persona, demostrando que se estableció contacto entre el parásito y el humano en la comunidad Primero de Mayo
4. El Potencial de Transmisión de *O. volvulus* por *S. metallicum* fue de 0.971 L3/persona, siendo un valor que satisface el criterio de “ausencia o casi ausencia” de la transmisión de acuerdo al criterio de la OMS adoptado por OEPA.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abiose A. 1998. Onchocerca eye disease and the impact of Mectizan® Treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* **92**: 511-522.
- Aziz, M.A., S. Diallo, I.M. Diop, M. Lariviere and M. Porta. 1982. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. *Lancet.* **2**:171-173.
- Bartlett, A., D. Bidwell. A. Voller. 1975. Preliminary studies on the application of enzyme immunoassay in the detection of antibodies in onchocerciasis. *Tropenmed. Parasitol.* **26**:370-374.
- Basañez, M.G., J. Ricárdez-Esquinca. 2001. Models for the population biology and control of human onchocerciasis. *Trends Parasitol.* **17**:430-438.
- Basáñez, M.G., J.H.F. Remme, E.S. Alley, O. Bain, A. Shelley, G.F. Medley and R.M. Anderson. 1995. Density-dependent processes in the transmission of human onchocerciasis: relationship between the numbers of microfilariae ingested and successful larval development in the simuliid vector. *Parasitology.* **110**: 409-427.
- Blanks, J., F. Richards, F. Beltrán, R. Collins, E. Álvarez, G. Zea-Flores, B. Bauler, R. Cedillos, M. Heisler, D. Brangling-Bennett, W. Baldwin and M. Bayona. 1998. The Onchocerciasis Elimination Program for the Americas: a history of partnership. *Pan Am. J. Public Health.* **3**: 367-374.
- Boatin, B.A., F.O. Richards. 2006. Control of Onchocerciasis. *Adv. Parasitol.* **61**: 349-94.
- Bogitsh, J.B., C. Cheng. 1998. Blood and tissue nematodes in Human Parasitology. Academic Press. 2<sup>nd</sup> edition. USA. 390-391 pp.
- Bradley, J.E., M. Barbara, M. Athogo, L. Elson, G. R. Stewart and M. Boussinesq. 1998. A cocktail of recombinant *Onchocerca volvulus* antigens for serologic diagnosis with the potencial to predict the endemicity of onchocerciasis infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**:877-882.
- Brandling-Bennett, A.D., J. Anderson, H. Fuglsang and R.C. Collins. 1981. Onchocerciasis in Guatemala. epidemiology in fincas with various intensities of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**:970-981.
- Braun, G., N.M. McKechnie, V. Connor, C.E. Gilbert, F. Engelbrecht, J.A. Whitworth and D.W. Taylor. 1991. Immunological crossreactivity between a cloned of *Onchocerca volvulus* and a component of the retinal pigment epithelium. *J. Exp. Med.* **174**: 169-77.

- Cabrera, Z., R.M.E. Parkhouse. 1986. Identification of antigens of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca gibsoni* for diagnostic use. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**:225-231.
- Castaldi, M.O., M.O. Ortega. 1981. Contribución al estudio de la bioecología de los simúlidos (Díptera: Simuliidae) transmisores de la oncocercosis: Entomofauna asociada a las formas larvarias. *Fol. Ent. Mex.* **50**:97-107.
- Chávez, N.M. 1979. Epidemiología de la Oncocercosis en la República Mexicana. Época. *Salud Pública de México.* **3**:707-717.
- Chester, P., R. Clifton, E. Wayne. 1984. Parasitología Clínica. Segunda Edición. Editorial Interamericana. México: 399-401 y 405 pp.
- Collins, R.C., T. Lehmann, J.C. Vieira-García, R.H. Guderian. 1995. Vector competence of *Simulium exiguum* for *Onchocerca volvulus*: implications for the epidemiology of onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**: 213–218.
- Cox, F.E. 2002. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev.* **15**: 595-612.
- Cruz, O. 1987. Parasitología. Editor: Méndez, O. Segunda edición. México D.F 386-387 p
- Cupp, E.W., O. Brian, C. Duke, D. Mackenzie, J.R. Guzman, J.C. Vieira, J. Méndez-Galván, J. Castro, F. Richards, M. Sauerbrey, A. Dominguez, R. R., Eversole and M. S. Cupp. 2004. The effects of long-term community level treatment with ivermectin (Mectizan®) on adult *Onchocerca volvulus* in Latin America. *Am J Trop Med Hyg.* **71**: 602-607.
- Davies, J.B., L. Oskam, R. Luján, G.J. Schoone, C.C.M. Kroon, L.A. López-Martínez and A.J. Paniagua-Álvarez. 1998. Detection of *Onchocerca volvulus* DNA in pools of wild-caught *Simulium ochraceum* by use of the polimerase chain reaction. *Annals of Trop. Med. and Parasitol.* **92**:295-304.
- Duerr, HP, K. Dietz, M. Eichner. 2005. Determinants of the eradicability of filarial infections: a conceptual approach. *Trends Parasitol.* **21**: 88-96.
- Duke, B.O.L. 1993. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop. Med. Parasitol.* **44**:61-68.
- Egbert, P. R., D.W. Jacobson, S. Fiadovor, P. Dadzie, K. Ellingson. 2005. Onchocerciasis: a potential risk factor for glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* **89**: 796-798.
- Engelbrecht, F., H. Schulz-Key. 1984. Observations on adult *Onchocerca volvulus* maintained *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **8**:212-215.

- Erttmann, K.D., S.E. Meredith, B. M. Greene, T. R. Unnasch. 1990. Isolation and characterization of form specific DNA sequence of *O. volvulus*. *Acta Leidensia*. **59**:253-260.
- Erttmann, K.D., T.R. Unnasch, B.M. Greene, E.J. Albiez, J. Boateng, A.M. Denke, J.J. Ferraroni, M. Karam, H. Schulz-Key and P. N. Williams. 1987. A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. *Nature*. **327**:415-417.
- Fernández, A., J. Ramírez-Pérez, H. Shuler, N. Rodríguez. Reacción en cadena de Polimerasa (PCR) para detectar formas infectivas de *Onchocerca volvulus* en *Simulium metallicum s.l.* (Diptera: Simuliidae), en áreas endémicas de Venezuela. 2008. *Bol. Mal. Salud Amb.* 1:35-43.
- Fuglsang, H., J. Anderson. 1977. The concentration of microfilaria in the skin near the eye as a simple measure of the severity of onchocerciasis in a community and as an indicator of danger to the eye. *Tropenmed. Parasitol.* **28**:63-67.
- Gbakima, A.T., T.B. Nutman, J.E. Bradley, L.A. McReynolds, M.D. Winget, Y. Hong and A. Scot. 1996. Immunoglobulin G subclass responses of children during infection with *Onchocerca volvulus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **3**:98-104
- Gómez-Priego, A., R. Mendoza, J. De la Rosa. 2005. Prevalence of Antibodies to *Onchocerca volvulus* in Residents of Oaxaca, Mexico, Treated for 10 years with ivermectin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**: 40-43.
- Guevara, A.G., J.C. Viera, B.G. Lilley, A. López, N. Vieira, J. Rumbela, R. Collins, C.R. Katholi and T.R. Unnasch. 2003. Entomological evaluation by pool screen polymerase chain reaction of *Onchocerca volvulus* transmission in Ecuador following mass Mectizan™ distribution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**:222-227.
- Hall, L.R., E. Pearlman. 1999. Pathogenesis of onchocercal keratitis (River Blindness). *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 445-453.
- Hernández Arreola, H. 1979. Epidemiología general y control de la oncocercosis. Gómez Priego M. (editor) en; La oncocercosis en México memorias. CIES. 23p. A. Hoerauf, D.W. Büttner, O. Adjei, E. Pearlman. 2003. Onchocerciasis. *BMJ.* **326**: 207-210.
- Hoerauf, A., S. Mand, L. Volkmann, M. Büttner, Y. Marfo- Debrekyei, M. Taylor, O. Adjei and D. W. Büttner. 2003. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes Infect.* **5**: 261-273.

- Hoerauf, A., N. Brattig. 2002. Resistance and susceptibility in human onchocerciasis – beyond Th1 vs. Th2. *Trends Parasitol.* **18**: 25–31.
- IACO (2001). Relatoría de la XI Conferencia Interamericana sobre Oncocercosis (IACO), México, D.F. 27-29 noviembre 2001, 96 pp.
- Ibáñez-Bernal, S. y S. Coscarón. 1996. Simuliidae (Diptera). En Llorente: J., A. García y E. González (Eds). Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. 579-583. pp
- Katholi, C.R., L. Toé, A. Merrriweather and T. R. Unnasch. 1995. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. *J. Inf. Dis.* **172**:1414-1417.
- Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Scheckenberger and W.C. Winn. 2001. Parasitología en Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Reimpresión de la quinta edición. México D.F 1104 p.
- Kotz, S, N.L. Johnson, C.B. Read. 1988. Method of statistical differentials. Encyclopedia of Statistical Sciences. New York: John Wiley & Sons, 646–647.
- Lindblade, K.A., B. Arana, G. Zea-Flores, N. Rizzo, C.H. Porter, A. Dominguez-Vasquez, N. Cruz-Ortiz, T.R. Unnasch, G.A. Punkosdy, J. Richards, M. Sauerbrey, J. Castro, O. Catú, E. Oliva and F.O. Richards. 2007. Eradication of *Onchocerca volvulus* transmission in the Santa Rosa focus of Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.*
- Luang-Hu, L. Vision 2020 and Prevention of Blindness: Is it Revelant of Achievable in the Modern Era?. 2006. *Ann Acad Med Singap.* **35**: 215-222.
- Magdi, M.A. 2006. Immunologic aspects of the pathogenesis of human onchocerciasis. Tesis de Doctorado. Stockholm University. 14-17 pp.
- Maia-Herzog, M., A.J. Shelley, J.E. Bradley, A.P. Luna-Dias, R.H. Calvao, C. Lowry, M. Camargo, J. M. Rubio, R. J. Post and J. E. Coelho. 1999. Discovery of a new focus of human onchocerciasis in central Brazil. *Transactions of the Royal Society of Trop. Med. Hyg.* **93**: 235-239.
- Marchón-Silva, V., J. Charles Caer, R. James Post, M. Maia-Herzog and O. Fernández. 2007. Detection of *Onchocerca volvulus* (Nematode:Onchocerciade) infection in vectors from Amazonian Brazil following mass Mectizan TM distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**:197-202.

- Martin-Tellaache, A., J. Ramírez-Hernández, J.I. Santos-Preciado, J. Méndez-Galván. 1998. Onchocerciasis: changes in transmission in Mexico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92**:117-119.
- Meredith, S.E.O., T.R. Unnasch, M. Karam, W. F. Piessens and D. F. Wirth. 1989. Cloning and characterization of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 1-10.
- Murdoch, M. E., R. J. Hay, C. D. Mackenzie, J. F. Williams, H. W. Ghalib, S. Cousens, B. R. Jones and A. Abiose. 1993. A clinical classification and grading system of the cutaneous changes in onchocerciasis. *Br. J. Dermatol.* **129**: 260-269.
- Okulicz, J.F., A.S. Stibich, D.M. Elston and R.A. Schwartz. 2004. Cutaneous onchocercoma. *Int J Dermatol.* **43**:170-172.
- Ortega, G.M., C.M. Oliver. Entomología de la oncocercosis en el Soconusco, Chiapas. Estudios sobre dinámica de población de las tres especies de simúlidos considerados transmisores de oncocercosis en el foco sur de Chiapas. 1985. *Folia Entomo Mex.* **66**: 1 19-136.
- Oskam, L.G.L., Schoone, C.C. Kroon, R. Lujan and J. B. Davies. 1996. Polymerase Chain Reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of black flies. *Trop. Med. Int. Health.* **1**:522-527.
- Pearlman, E., J. Lass. 1994. Keratitis due to onchocerciasis. *Ophthalmol. Clin. North. Am.* **7**: 641-648.
- Philipp, M., A. Gómez-Priego, R.M.E. Parkhouse, M.W. Davies, N.W.T. Clark, B.M. Ogilvie, and F. Beltrán-Hernández. 1984. Identification of an antigen of *Onchocerca volvulus* of possible diagnostic use. *Parasitology.* **89**:295-309.
- Ramírez-Pérez, J. 1977. Estudio sobre la morfología de *Simulium metallicum*, vector de la oncocercosis humana en Venezuela. Organización Panamericana de la Salud 30-35 pp.
- Ramirez-Pérez, J. 1985. Vectores de la oncocercosis humana en la Región Neotropical. *Bol. Of Sanit. Panam.* 98(2).
- Ramírez-Pérez, J., E. Rassi, J. Convit, A. Ramírez. 1976. Importancia epidemiológica de los grupos de edad en las poblaciones de *Simulium metallicum* (Díptera: Simuliidae) en Venezuela. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 140 pp.
- Rodríguez Pérez, M. A., F. Reyes Villanueva. 1994. Efecto de la ivermectina sobre la transmisión de *Onchocerca volvulus* en México. *Salud Pública Mex.* **36**:281-290.

- Rodríguez-Pérez, M A, M.H. Rodríguez, H.M. Margeli-Pérez, A. Rivas-Alcalá. 1995. Effect of semiannual treatments of ivermectin on the prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* skin infection, ocular lesions, and infectivity of *Simulium ochraceum* populations in southern Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52(5)**:429-434.
- Rodríguez-Pérez, M. A. 2005. Herramientas moleculares para el combate de la oncocercosis en México. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**:112-129.
- Rodríguez-Pérez, M.A., A.R. Rivas-Alcalá. 1991. Algunos problemas en la investigación para el control de la transmisión de *Onchocerca volvulus* en México. *Salud Pública de México* **33**: 493-503.
- Rodríguez-Pérez, M.A., B.G. Lilley, A. Domínguez-Vázquez, R. Segura-Arenas, C. Lizarazo-Ortega, A. Mendoza-Herrera, F. Reyes-Villanueva and T.R. Unnasch. 2004. Polymerase chain reaction monitoring of transmission of *Onchocerca volvulus* in two endemic states in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 38-45.
- Rodríguez-Pérez, M.A., Katholi C.R., H.K. Hassan and T. R. Unnasch. 2006. Large-Scale entomologic assessment of *Onchocerca volvulus* transmission by Poolscreen PCR in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**:1026-1033.
- Rodríguez-Pérez, M.A., M.H. Rodríguez-López. 1994. Oncocercosis en J.L. Valdespino-Gómez, O. V. Castrejón, A. Escobar-Gutiérrez, A. del Río-Zolezzi, S. Ibáñez-Bernal, C. Magos-López (eds). Enfermedades Tropicales de México, Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud de México. México D.F. 325-333 pp.
- Ros-Moreno, R.M., M.J. Moreno-Guzmán, A. Jiménez-Gonzalez and F. Rodríguez Caabeiro. 1999. Interaction of ivermectin with gamma-aminobutyric acid receptors en *Trichinella spiralis* muscle larvae, *Parasitology Research* **85**: 320-323.
- Schlié-Guzmán, M.A, A.R. Rivas-Alcalá. 1988. Inmunodiagnóstico de la oncocercosis. *Boletín Chileno de Parasitología* **43**:11-15.
- Schulz-Key, H., M. Karam.1986. Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*. *Parasitol Today.* **2**: 284-286.
- Taylor, M.J., A. Hoerauf. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol. Today.* **15**:437-442.
- Unnasch, T.R., S.E.O. Meredith. 1996. The use of degenerate primers in conjunction with strain and species oligonucleotides to classify *Onchocerca volvulus*. Clapp JP. ed. Methods in Molecular Biology. Volume 50. Species Diagnostics Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods. Totowa, NJ: Humana Press, Inc., 293–303 pp.

- Vargas, L. 1960. Consideraciones entomológicas relacionadas con la interrupción de la transmisión de la oncocercosis en México y Guatemala. *Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales* **20**: 237-245.
- Vieira, J.C., P.J. Cooper, R. Lovato, T. Mancero, J. Rivera, R. Proaño, A.A. López, R.H. Guderian and J. Rumbea: Impact of long-term treatment of onchocerciasis with ivermectin in Ecuador: potential for elimination of infection. *BMC Medicine* 2007, 5:9.
- Whitworth, J. 1998. Onchocerciasis. in microbiology and microbial infections (ed. F. E. G. Cox, J. P. Kreier, D. E. V. P., Wakelin, L., Collier, A., Balows y Sussman M. G. E.). Topley y Wilson's (Arnold), London, U.K.
- Williams, C.B. 1937. The use of logarithms in the interpretation of certain entomological problems. *Annals of Applied Biology*, **24**: 404-410.
- World Health Organization. 1995. Onchocerciasis and its control. *Technical Report Series 852*.
- World Health Organization. Criteria for certification of interruption of transmission/elimination of human onchocerciasis. Geneva: World Health Organization; 2001. Document No.: WHO/CDS/CEE/2001.18a.
- Zea-Flores, R., F.O. Richards, C. Gonzalez- Peralta, J. Castro Ramirez, G. Zea-Flores, R. C. Collins, E. Cupp. 1992. Adverse reactions after community treatment of onchocerciasis with ivermectin in Guatemala. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 663-666.

## 11. APÉNDICES

### APÉNDICE A. Comunidades del foco Soconusco incluidas en el estudio.

| MUNICIPIO  | COMUNIDAD             | NIVEL ENDÉMICO | TIPO DE COMUNIDAD |
|------------|-----------------------|----------------|-------------------|
| Huixtla    | Estrella Roja         | Mesoendémico   | Centinela         |
| Huixtla    | José María Morelos    | Hiperendémico  | Centinela         |
| Acacoyagua | Nueva Reforma Agraria | Hiperendémico  | Centinela         |
| Acacoyagua | Golondrinas           | Mesoendémico   | Extra-centinela   |
| Motozintla | Primero de Mayo       | Hiperendémico  | Centinela         |

### APÉNDICE B. Ubicación geográfica de las comunidades muestreadas en el foco Soconusco.

| MUNICIPIO  | COMUNIDAD             | LATITUD<br>(° ' ") | LONGITUD<br>(° ' ") | ELEVACIÓN<br>(msnm) |
|------------|-----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Huixtla    | Estrella Roja         | 15 16 30           | 92 28 56            | 660                 |
| Huixtla    | José María Morelos    | 15 14 03           | 92 27 58            | 1400                |
| Acacoyagua | Nueva Reforma Agraria | 15 26 04           | 92 45 04            | 500                 |
| Acacoyagua | Golondrinas           | 15 26 06           | 92 26 38            | 920                 |
| Motozintla | Primero de Mayo       | 15 14 31           | 92 18 04            | 1300                |

## 12. ANEXO: Preparación de soluciones

### Buffer de homogenización

100 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)  
1 mM EDTA  
0.1 % SDS

### Solución de ADN de esperma de salmón 250 ng/ $\mu$ L

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| ADN esperma de salmón 10 mg/ml | 25 $\mu$ L  |
| Agua destilada estéril         | 975 $\mu$ L |

### Solución de NaI

NaI            90.3 g  
Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>        1.5 g  
Agua destilada estéril 100 ml  
Filtrar la solución con papel filtro Whatman No. 1

### Solución de Etanol para lavado

Solución 20X: 2 M NaCl, 200 mM Tris HCl (pH 7.5) 20 mM EDTA  
Para un litro:  
Etanol absoluto:    500 ml  
Solución 20 X            50 ml  
Agua destilada        450 ml  
Almacenar a -20 °C

### Buffer SSPE/SDS

1X SSPE, 0.1 % SDS

### 13. GLOSARIO

**PCR** (Reacción en cadena de la Polimerasa): proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción. Al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso.

**Comunidad hipoendémica:** Comunidad en la que se realizó estudio de biopsia de piel en 30 hombres adultos residentes de dicha comunidad y se encontró menos del 20% de biopsias positivas a microfilarias.

**Comunidad mesoendémica:** Comunidad en la que se realizó estudio de biopsia de piel en 30 hombres adultos residentes de dicha comunidad y se encontró más de 20% pero menos de 60% de biopsias positivas a microfilarias.

**Comunidad hiperendémica:** Comunidad en la que se realizó estudio de biopsia de piel en 30 hombres adultos residentes de dicha comunidad y se encontró más del 60 % de biopsias positivas a microfilarias.

**OEPA** (Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas): Es una iniciativa regional que resultó, de la Resolución XIV de la XXXV Asamblea del Consejo Directivo de la Oficina Sanitaria Panamericana (OPS), firmada en 1991 por los ministerios de salud de los países afectados por la oncocercosis en el continente.

**Comunidad centinela:** Comunidad que se selecciona para tener seguimiento especial, a través de la realización periódica de Evaluaciones Epidemiológicas a Profundidad.

**Incidencia:** Es la tasa de casos nuevos aparecidos en una población en un intervalo de tiempo definido.

**Prevalencia:** Es la proporción infectada de la población huésped en un momento determinado.

**Morbilidad:** Se define como la presencia de signos patológicos causados por la oncocercosis.

**Supresión de la infectividad:** Significa que se ha pasado a la ausencia de larvas infectivas (L3) en la población vectorial de *Simulium*, según indican los resultados de la PCR u otro método válido y, que registra simultáneamente una incidencia acumulada a lo largo de 5 años de  $< 1$  caso nuevo por cada 1000 personas.

**Interrupción de la transmisión:** Significa que se ha conseguido interrumpir permanentemente la transmisión en un área claramente definida porque todos los gusanos adultos alojados en la población humana de esa área han muerto de vejez o han sido exterminados mediante alguna otra intervención. Esto debe ocurrir después del establecimiento de la interrupción sostenida de la infectividad.

**País endémico:** Son los países donde hay morbilidad por oncocercosis, transmisión de ésta infección por el parásito causante de la misma.

**Foco de oncocercosis endémica:** Es una zona de un país donde se mantiene un ciclo local de transmisión de *Onchocerca volvulus* que causa infecciones autóctonas.