

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



EVALUACIÓN ENTOMOLÓGICA MOLECULAR EN 3 COMUNIDADES
INCLUIDAS EN EL PROGRAMA MECTIZAN® PARA LA ELIMINACIÓN DE LA
ONCOCERCOSIS EN EL FOCO SUR DE CHIAPAS

POR:

JOSÉ DELFINO LÓPEZ SÁNCHEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

NOVIEMBRE DEL 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

EVALUACIÓN ENTOMOLÓGICA MOLECULAR EN 3 COMUNIDADES
INCLUIDAS EN EL PROGRAMA MECTIZAN® PARA LA ELIMINACIÓN DE LA
ONCOCERCOSIS EN EL FOCO SUR DE CHIAPAS

POR

JOSÉ DELFINO LÓPEZ SÁNCHEZ

TESIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

APROBADA:


DR. ALVARO FERNANDO RODRIGUEZ RIVERA

ASESOR


DR. MARIO ALBERTO RODRIGUEZ PEREZ

ASESOR


M.C. CRISTIAN LIZARAZO ORTEGA

ASESOR


M.C. JOSE ARMANDO NAJERA CASTRO

EL COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL


ING. JOSÉ RODOLFO PEÑA ORANDAY

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

NOVIEMBRE DEL 2009

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL ii

DEDICATORIA

- Este trabajo ésta dedicada para mis padres: *José López y Marina Sánchez*, que con su gran apoyo incondicional en todo momento y constante lucha para impulsarme siempre a seguir adelante para llegar a hacer un buen ser humano en la vida.
- A mis hermanos: *Obdulia, Rigoberto*, por brindarme la confianza en este largo camino de la vocación y por los bellos momentos compartidos, y sobre todo a *Yonathan* que ha sido mi gran impulso para salir adelante en todo momento.
- A mis sobrinos: *Ángel Jacob y Ángel Enrique*, para darles un buen ejemplo, en el camino a seguir.

INDICE

INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1 Distribución mundial de la oncocercosis	3
2.2 Distribución en América Latina.....	4
2.3 Distribución de la oncocercosis en México	5
2.4 Vectores de la oncocercosis en México	7
2.5 Ciclo de vida del vector <i>Simulium ochraceum s.l.</i>	8
2.6 El Ciclo de vida del parásito <i>O. volvulus</i>	10
2.7 La patología y manifestaciones clínicas producidas por la infección con <i>O. volvulus</i>	12
2.7.1 Oncocercomas (nódulos subcutáneos).....	12
2.7.2 Manifestaciones dermatológicas (patología dérmica).....	13
2.7.3 Manifestaciones oftalmológicas (patología ocular)	13
2.8 Métodos de diagnóstico de la oncocercosis en el huésped humano	14
2.8.1 Método Clínico	14
2.8.2 Método Parasitológico	14
2.8.3 Método Farmacológico.....	15
2.8.4 Métodos Inmunológicos	15
2.8.5 Desarrollo de sondas de ADN y ensayos de PCR para el diagnóstico de la <i>O. volvulus</i>	16
2.9 Programa para el control de la Oncocercosis en América Latina.....	18

2.10 Control y eliminación de la oncocercosis en México	19
2.11 Tratamiento de la oncocercosis	20
2.12 Cobertura con ivermectina en comunidades centinelas de México.....	21
2.13 Monitoreo y evaluación de la transmisión de la oncocercosis.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. HIPÓTESIS	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Área de Estudio.....	27
6.2 Estrategia utilizada para el estudio entomológico	28
6.3 Recolecta de los simúlidos.....	28
6.4 Separación de cabezas y cuerpos de los simúlidos.....	29
6.5 Extracción del ADN genómico.....	30
6.6 Purificación del ADN	30
6.7 Amplificación por PCR	31
6.8 Detección de productos de PCR por ELISA y su interpretación.....	32
6.9 Análisis de datos	33
7. RESULTADOS	35
7.1 Estudio entomológico y obtención de la tasa de picadura	35
7.2 Detección de productos de PCR por ELISA y su interpretación.....	36
7.3 Análisis de los datos mediante el programa de algoritmo “Poolscreen” ..	37
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES.....	42
10. LITERATURA CITADA.....	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución mundial de la oncocercosis.....	3
Cuadro 2. Total de ejemplares de <i>S. ochraceum</i> s.l. recolectados y la tasa de picadura / hombre por periodo de las tres comunidades del foco sur de Chiapas, México.	35
Cuadro 3. Número de lotes de cabezas y cuerpos de simúlidos analizados por PCR y detección de productos de PCR por ELISA.	37
Cuadro 4. Tasa de Infección/Infectividad y potencial de transmisión de <i>O. volvulus</i> por <i>S. ochraceum</i> s.l. para las comunidades estudiadas del foco sur de Chiapas, México.	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los 13 focos de la oncocercosis en América Latina.....	4
Figura 2. Distribución de los tres focos de oncocercosis en México.	5
Figura 3. Especies de simúlidos considerados como vectores principales de oncocercosis en los focos endémicos de México.	7
Figura 4. Ciclo biológico de un <i>Simulium</i> en la naturaleza.	9
Figura 5. Ciclo vital de <i>O. volvulus</i> en el humano y en el vector.	11
Figura 6. Evolución de tratamientos con Mectizan en México.....	21
Figura 7. Ubicación de las comunidades analizadas en este trabajo. En el mapa se muestra los municipios donde se encuentran ubicadas las comunidades donde se recolectaron los ejemplares de <i>S. ochraceum s.l.</i>	27
Figura 8. Detección de productos de PCR con las sonda OVS2 por ELISA. Reacciones positivas por PCR-ELISA de cuerpos procedentes de la comunidad Morelos.	36
Figura 9. Tasa de infección parasitaria (tasa por 2,000 simúlidos paridos) de <i>O. volvulus</i> por <i>S. ochraceum s.l.</i> en las tres comunidades del foco sur de Chiapas.	38

AGRADECIMIENTOS

- Al Centro de Biotecnología Genómica-IPN y a todo el personal de este Centro por su apoyo.
- Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez, por su asesoría y dirección en el desarrollo de mi tesis.
- Al Dr. Álvaro Fernando Rodríguez Rivera, por su asesoría y dirección en el desarrollo de mi tesis.
- Al M.C. Cristian Lizarazo Ortega, por su gran apoyo y dedicación en el desarrollo de mi tesis.
- Al M.C. J. Armando Nájera Castro, por su disposición y asesoría para este trabajo de tesis.
- Al M.C. Miguel Ángel Pérez Rodríguez, por su valioso e importante orientación y gran apoyo brindado.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGAB	Ácido gama amino butírico
dNTP`s	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DDT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)
IACO	Conferencia Interamericana sobre Oncocercosis
L3	Larvas del tercer estadio
Mfs	Microfilarias
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NaI	Yoduro de sodio
OCP	Programa de Control de Oncocercosis en el Oeste de África (Onchocerciasis Control Programme in West Africa)
OEPA	Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (Onchocerciasis Elimination Program for the Americas)
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
Pb	Pares de bases
Rpm	Revoluciones por minuto
s.l.	sensu lato (en sentido amplio)
Taq	ADN Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
WHO/OMS	World Health Organization/Organización Mundial de la salud
µl	Microlitros

RESUMEN

La presente investigación consistió en llevar estudios epidemiológicos en comunidades centinela y extra-centinela del foco sur de Chiapas. En total, se recolectaron 36,279 ejemplares de *S. ochraceum* s.l. Todos fueron sometidos a ruptura mecánica para separar cabezas y cuerpo. Las cabezas y cuerpos fueron separadas en grupos de 50 para la extracción de ADN genómico. El ADN fue utilizado para evaluar la infectividad natural por *Onchocerca volvulus*, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con oligonucleótidos específicos, con la finalidad de estimar el impacto que ha tenido la estrategia de múltiples tratamientos con ivermectina, sobre la transmisión del parásito *O. volvulus* por *S. ochraceum* s.l. La prevalencia de infectividad e infecciosa de las moscas, fue estimada usando el algoritmo de Poolscreen. En la comunidad de Morelos se encontró dos lotes de cuerpos de moscas positivas a la prueba de ADN del parásito, presentó una tasa de infección parasitaria de 0.41/2,000 (IC-95%= 0.024 – 0.092), lo que proporcionó evidencia de transmisión autóctona en esta comunidad. En la comunidad Las Golondrinas y Las Nubes II no se encontraron lotes positivos a la prueba de ADN del parásito. Para las tres comunidades el potencial de transmisión estacional fue de 0 L3s por persona, lo cual se encuentra bajo del “umbral” señalado por la OMS. En general, podemos concluir que el programa de eliminación de la oncocercosis en México, basado con múltiples tratamiento con ivermectina, ha logrado su primer objetivo, el de suprimir la transmisión del parásito en las tres comunidades estudiados del foco sur de Chiapas, México.

Palabras clave: Transmisión, *Onchocerca volvulus*, *Simulium ochraceum* s.l. PCR-ELISA, ADN, ivermectina, México.

1. INTRODUCCIÓN

La oncocercosis humana es una enfermedad parasitaria de evolución crónica causada por el nemátodo *Onchocerca volvulus* y transmitida únicamente por la mordedura de moscas hembras infectados del género *Simulium* (Robles, 1919). Se caracteriza por provocar en el individuo afectado lesiones cutáneas severas, acompañadas de prurito y daños oculares que pueden causar una pérdida irreversible de la vista (WHO, 2004). Dado que los vectores son insectos que se crían en ríos y arroyos de corriente rápida y pican a los seres humanos en las proximidades de esos sitios la enfermedad suele llamarse también como ceguera de los ríos. En México y Guatemala, debido a los signos que produce, la oncocercosis también se denomina mal morado o erisipela de la costa (Rivas y Schelley, 1987).

La oncocercosis es endémica en países de África, Asia y América Latina, presentando siempre una distribución focalizada restringida por la presencia del vector y el parásito. A pesar que no es una enfermedad que produce la muerte directa, contribuye una de las principales causas de ceguera en el mundo con 18 millones de personas infectadas con el parásito (WHO, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a esta enfermedad como uno de los mayores problemas de salud pública transmitidas por vectores, ocupando el tercer lugar entre las causas principales de ceguera de origen infeccioso, seguida de las cataratas y el tracoma. Sin embargo, la mayor parte de los casos graves de la enfermedad están en el África, al sur del Sahara (OMS, 1987; WHO, 1991).

En México, la transmisión ocurre en tres focos endémicos bien definidos, uno ubicado al norte del estado de Oaxaca y dos de ellos ubicados al norte y sur del estado de Chiapas. De estos, el foco sur de chipas ó “Soconusco”, es el más importante por su extensión y prevalencia de la enfermedad, prologándose con el foco endémico del noroeste de Guatemala “foco Huehuetenango” (IACO, 2001). En la región endémica de México-Guatemala la oncocercosis ocurre en habitantes de plantaciones de café y el periodo de máxima transmisión coincide con la época se sequía temprana con la presencia de poblaciones viejas del vector principal, *S. ochraceum* s.l. (Rodríguez-Pérez y Reyes Villanueva, 1994).

El tratamiento para el control de la oncocercosis en México se ha documentado que a nivel comunitario, después de administrar tres dosis semestrales de ivermectina junto con nodulectomía la intensidad de la infección sistémica se reduce en un 79%, la prevalencia de lesiones oculares disminuye en un 68% y la población con infección por *O. volvulus* se reduce en un 66%, respectivamente (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1995). Sin embargo, la perspectiva de interrupción de la transmisión en varias comunidades endémicas de México no se había concretado hasta el año 2001 (IACO, 2001), Actualmente, la interrupción de la transmisión debido al tratamiento con ivermectina ha ocurrido en el foco Oaxaca y norte de Chiapas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

En México, para la determinación de la tasa de infección de poblaciones naturales de *S. ochraceum* s.l. con *O. volvulus* se ha utilizado la evaluación entomológica como una medida de monitoreo de la efectividad de las medidas de control. En el pasado, la determinación de dicha tasa de infección se llevó a cabo mediante la disección individual al microscopio de hembras *S. ochraceum* s.l. colectados en campo. Esta técnica sigue siendo válida para estimar la transmisión, sin embargo, conforme a los programas de ivermectina reducen la prevalencia de infección de los simúlidos y, por tanto, se bajan los niveles de transmisión, es evidente la necesidad de disecar miles de simúlidos para poder evaluar su tasa de infección, lo que hace impráctico el método (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1999).

Por consiguiente; en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos basados en pruebas de ADN y sistemas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con alta sensibilidad y especificidad para detectar larvas de *O. volvulus* en los vectores (Zimmerman *et al.*, 1993). El desarrollo de estos métodos moleculares, provee ventajas prácticas sobre la disección tradicional de *S. ochraceum* s.l., puesto que habilita el análisis de un mayor número de muestras que son recolectadas simultáneamente en diferentes comunidades (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1999). Igualmente, se describió un programa para computadoras con un algoritmo estadístico conocido como "Poolscreen", el cual fue diseñado para calcular el índice de infección en una población de *simulium* (Katholi *et al.*, 1995).

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Distribución mundial de la oncocercosis

La oncocercosis humana transmitida por *S. ochraceum* s.l. se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, presentándose en 34 países, la prevalencia más alta se registra en África con 26 países, en América están afectados 6 países y 2 de Asia (OMS, 1987). En el cuadro 1 se presenta la distribución mundial de la oncocercosis. De acuerdo con la OMS, aproximadamente 100 millones de personas en el mundo viven en áreas donde la enfermedad está presente y, por lo tanto, están en riesgo de enfermarse, de las cuales 18 millones de personas están infectadas por la oncocercosis (WHO, 2006); la mayoría de éstas (>90%) viven en África, y alrededor de 270,000 están ciegos y otros 800,000 tienen grandes problemas visuales (WHO, 1995).

Continente	No. de países afectados	Países afectados	Población total (millones)
África	26	Oeste de África, África central, Angola, Camerún, Chad, Congo, Dahomey, Alto Volta, Etiopia, Gabón, Ghana, Guinea, Costa de Marfil, Liberia, Mali, Níger, Nigeria, Senegal, Sierra Leona, Sudan, Togo, Kenya, Zaire, Malawi, Tanzania, Uganda.	293
América	6	México, Guatemala, Venezuela, Brasil, Colombia y Ecuador.	265
Asia	2	Yemen y Arabia del Sur.	20

Cuadro 1. Distribución mundial de la oncocercosis.

Fuente: OMS (1987).

2.2 Distribución en América Latina

En América Latina, la oncocercosis fue reportada, por primera vez, en Guatemala en el año de 1915 por el Dr. Rodolfo Robles (Martínez, 1962). Desde el descubrimiento, se han delimitado 13 focos oncocercosos, dividiéndose en 6 países: Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela (WHO, 2004). En la figura 1 se muestra la distribución de los focos endémicos de oncocercosis en seis países de América Latina. En los focos endémicos más de 140,000 individuos están infectados con el parásito y 525.2543 más están en riesgo de contraer la enfermedad. Son aproximadamente 2,000 comunidades donde se estima la prevalencia de la enfermedad (WHO, 2004). Más del 93.5 % de las comunidades endémicas se concentran en México, Venezuela y Guatemala (WHO, 2007).

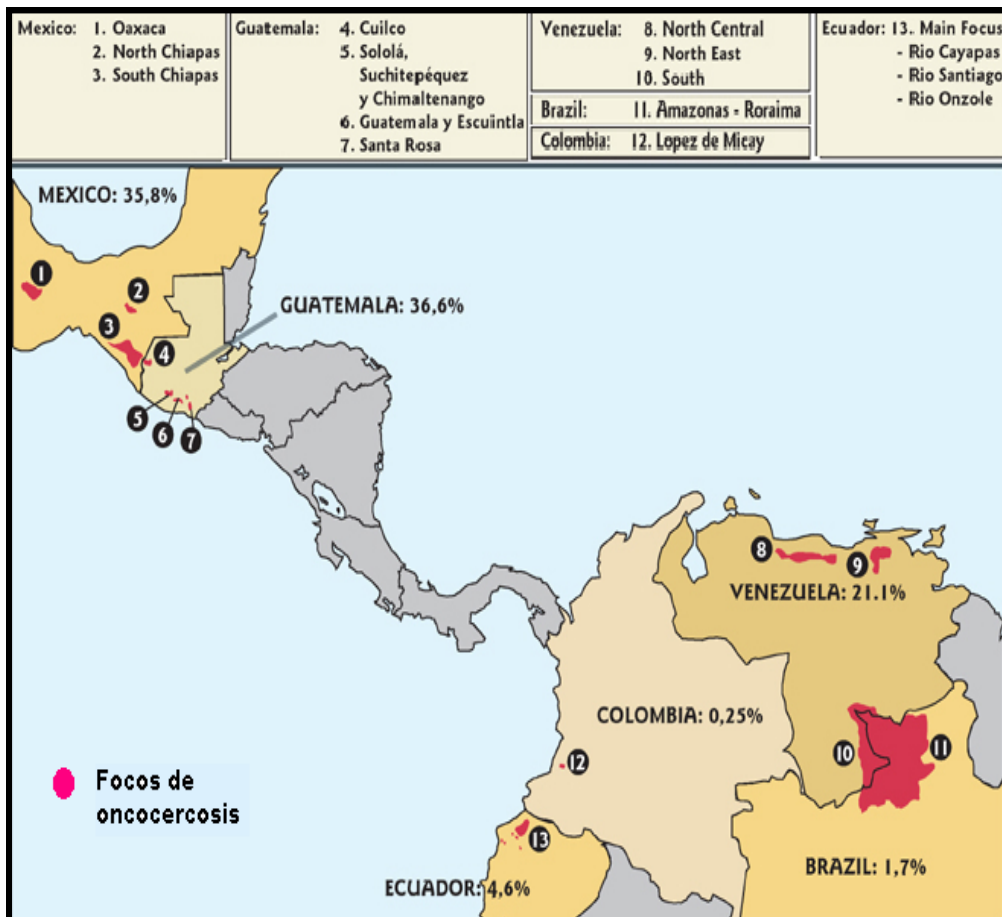


Figura 1. Distribución de los 13 focos de la oncocercosis en América Latina.

Fuente: Internet: www.itg.be/.../41_Filariasisp4.htm.

2.3 Distribución de la oncocercosis en México

En México se descubrieron los primeros casos de la enfermedad en 1923, en el foco Soconusco, por el médico alemán Fülleborn; la mayoría de ellos presentes en jornaleros del café provenientes de Guatemala (Vázquez-Castellanos, 1991; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). En la figura 2, se muestra la distribución de la oncocercosis en México. La enfermedad se presenta en tres focos endémicos: uno en el estado de Oaxaca y dos en el estado de Chiapas. El foco Oaxaca reside 48,924 personas en 98 comunidades, donde 11 son comunidades mesoendémicas y 87 hipoendémicas. 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. Donde 39 comunidades son hiperendémicas, 209 mesoendémicas y 311 hipoendémicas. Todas las comunidades hiperendémicas de México están en esta región (OEPA, 2008).



Figura 2. Distribución de los tres focos de oncocercosis en México.

Fuente: Internet: www.itg.be/.../41_Filariasisp4.htm.

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 esta 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, esta integrado por campesinos, que se dedican principalmente al cultivo del café. En la zona del Soconusco durante las épocas de siembra y cosecha del cultivo de café, existe una población flotante de regular magnitud, procedente principalmente de Guatemala (Hernández, 1979).

Tanto en México como en Guatemala donde se presenta la enfermedad, las áreas endémicas se encuentran sobre valles relativamente inaccesibles, 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 1,500 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 abundantes corrientes de escaso caudal y fuerte declive, con vegetación abundante, en donde se lleva a cabo el desarrollo larvario de los vectores, lo anterior hace muy complicada cualquier acción para su control. En nuestro país se ha demostrado que la altitud óptima para la transmisión de *O. volvulus* está alrededor de los 800 msnm y la temperatura media es de 23 a 31°C (Chávez, 1979; Rodríguez- Pérez, 1994).

2.4 Vectores de la oncocercosis en México

Tres especies de simúlidos están involucradas en la transmisión de oncocercosis en el foco de México: El vector principal es *S. ochraceum* s.l., aunque *S. metallicum* y *S. callidum* han sido involucrados como vectores secundarios (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994). La hembra de *S. ochraceum* s.l. se le reconoce por el tórax de color naranja, patas de color negro-castaño y abdomen de color amarillo y negro (Davies y Crosskey, 1991). Los simúlidos pertenecen a la clase Insecta, orden Díptera, suborden Nematocera, familia Simuliidae y al Género *Simulium* (Barrera y López, 1996). Los simúlidos, son también conocidos como moscas alazanas, moscas prietas o jejenes; son moscas frágiles con patas y antenas largas, así como venación reducida. Las hembras adultas son hematófagas y son vectores de enfermedades causadas por virus, protozoarios y helmintos, que además, muestran actividad alimenticia durante las horas luz, pero las picaduras son más frecuentes en las primeras horas de la mañana (Rodríguez-Pérez, 2005). Estas especies varían según el área geográfica donde habitan (OMS, 1987). En general prefieren áreas montañosas con relieve muy pronunciado, altura sobre 200 a 1200 msnm, climas templados, zonas con precipitación pluvial muy abundante y humedad atmosférica elevada (Biagi, 1993).

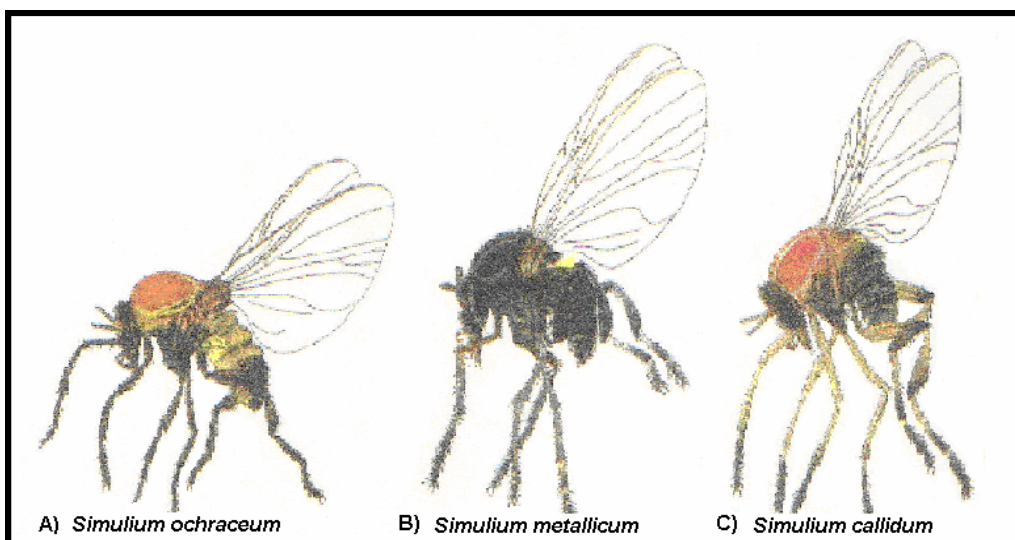


Figura 3. Especies de simúlidos considerados como vectores principales de oncocercosis en los focos endémicos de México.

Fuente: Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. INDRE S.S.A. (Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López, 1994).

2.5 Ciclo de vida del vector *Simulium ochraceum* s.l.

El ciclo de vida de los simúlidos se cumple en la zona tropical, en unos 50 días, con una fase inmadura o acuática de aproximadamente de 20 días (Ramírez-Pérez, 1977). Pasan por cuatro fases de metamorfosis conocidos como huevo, larva, pupa y adulto; es decir los simúlidos son holometábolos:

1.- Las hembras maduran sus huevos (200–500 por mosca) a partir de una comida sanguínea y los depositan en masas compactas sobre sustratos tales como rocas o piedras, plantas acuáticas y diversos tipos de vegetación sumergida o colgante presente en la corriente de quebradas y ríos.

2.- Los huevos eclosionan a los 2–4 días posterior a la ovoposición, dando origen a las larvas, las cuales a su vez pasan por 6–9 estadios larvales.

3.- 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.

4.- A los pocos días, emergen los adultos. Los adultos (machos y hembras) pasan un período de maduración sexual y una vez que copulan, la hembra iniciará una búsqueda de alimentación sanguínea. La ovogénesis, se desencadena una vez que el insecto termina la alimentación sanguínea (Yagamata y Kanayama, 1985).

La actividad alimenticia de los simúlidos es diurna, pero las picaduras son más frecuentes en las primeras horas de la mañana (Davies y Crosskey, 1991). En general, la mayor actividad a determinadas horas del día depende 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. En cuanto a los hábitos, es antropofílica y por lo general, prefiere para alimentarse en las regiones superiores del cuerpo humano. Desde el punto de vista epidemiológico, la fase adulta de los simúlidos es la que representa la mayor importancia, porque son las hembras adultas las que tienen el hábito hematófago y, por lo tanto, son las responsables de la transmisión del parásito *O. volvulus* (Chávez, 1979; Tang *et al.*, 1996).

Para *S. ochraceum s.l.* el ciclo gonadotrófico, es decir, el tiempo que transcurre entre una alimentación y la puesta de huevos en los criaderos es de dos a cuatro días a temperatura de 22°C y 28°C. Así, el número de días para el ciclo gonadotrófico varía según la temperatura (Duke, 1968; Takaoka *et al.*, 1982; Cheke, 1995). Aunque *S. ochraceum s.l.* presenta un comportamiento agresivo de búsqueda y alimentación sobre humanos, el índice de infección natural de las formas infectantes del parásito es muy baja (<1%) a consecuencia de la gran cantidad de microfilarias destruidas por los dientes cibariales (que se localizan en la porción bucofaríngea) del insecto (Shelley, 1994). En la figura 4 muestra las diferentes fases o estadios del desarrollo de los simúlidos.

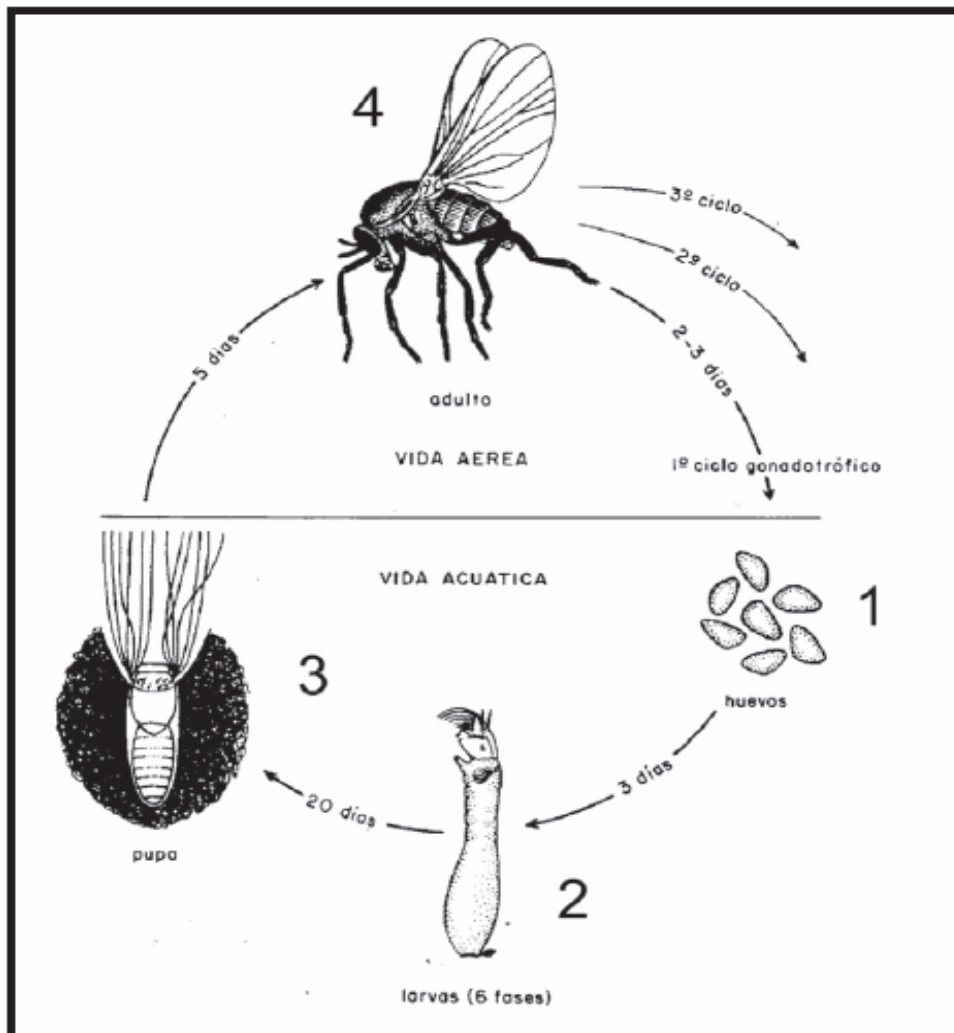


Figura 4. Ciclo biológico de un *Simulium* en la naturaleza.

Fuente: Sección de estudios de Vectores de oncocercosis (Ramírez-Pérez, 1977).

2.6 El Ciclo de vida del parásito *O. volvulus*

La filaria *O. volvulus* pasa a través de varios estadios durante su ciclo de vida, el cual se desarrolla obligatoriamente entre el humano (hospedador) y el insecto *Simulium* (vector) (figura 5). Las personas infectadas pasan a través de la picadura de los simúlidos múltiples microfilarias, ahí se lleva a cabo una parte de su ciclo vital(1), los gusanos adultos viven en promedio ocho años en nódulos subcutáneos, pero pueden persistir hasta los 15 años (2), (3) (Albiez *et al.*, 1998). Los gusanos hembras son largos y delgados y pueden medir hasta unos 40 cm de largo; los machos son mucho más pequeños (2-4 cm). Dentro de dichos nódulos los gusanos hembra son fertilizados por los machos (3) y producen embriones microscópicos conocidos como microfilarias (4), de unos 250-300 μm de longitud. Un gusano hembra puede producir alrededor de 1,600 microfilarias por día y entre 10 millones de microfilarias durante toda su vida reproductiva y un individuo muy infectado puede albergar de 50-200 millones de éstas en su piel (Whitworth, 1998). En el huésped humano las microfilarias de piel pueden vivir de uno a tres años (Duke, 1993). Las microfilarias migran hacia la piel y los ojos. Una vez en la piel, las microfilarias pueden ser ingeridas junto con sangre humana por los simúlidos vectores (5), dentro de los cuales las microfilarias se desarrollan (pero no se multiplican). Este desarrollo tiene lugar dentro de la musculatura torácica del insecto (6), hacia donde las microfilarias han migrado desde el abdomen de la mosca. Las larvas del parásito pasan por los estadios L1 (entre 150 y 300 μm) (7) y L2 (entre 300 y 450 μm), hasta alcanzar el estadio infectante para el humano, denominado larvas de tercer estadio o L3 (entre 500 y 660 μm) (8). El desarrollo larvario desde microfilarias hasta larvas L3 en el vector requiere aproximadamente de una semana bajo condiciones de temperatura (24 y 28°C), período conocido como de incubación extrínseca del parásito. Las larvas infectantes, una vez completado su desarrollo, escapan del tórax y migran hacia la cabeza del insecto, situándose cerca del aparato bucal del jején (9). Cuando los jejenes infectantes pican nuevamente para succionar sangre, las larvas L3 entran al humano por la herida producida por las maxilas y mandíbulas del insecto al cortar la piel (Duke, 1993).

El período de vida de las microfilarias (mfs) se ha estimado entre seis y treinta meses y el período de desarrollo de las larvas en las moscas negras, es usualmente de ocho a doce días, dependiendo de la temperatura ambiental y de las especies transmisoras. La transmisión de *O. volvulus* puede variar en lugar y tiempo (Porter y Collins, 1988), y dependen de varios factores, entre ellos la relación de densidad hombre-vector, la longevidad y antropofilia del vector, la susceptibilidad al parásito y la cantidad de parásitos disponibles en una población humana (Duke, 1968). En los simúlidos el ciclo varia de acuerdo con la temperatura ambiental y la capacidad hospedante de las especies transmisoras (Ramírez-Pérez, 1985).

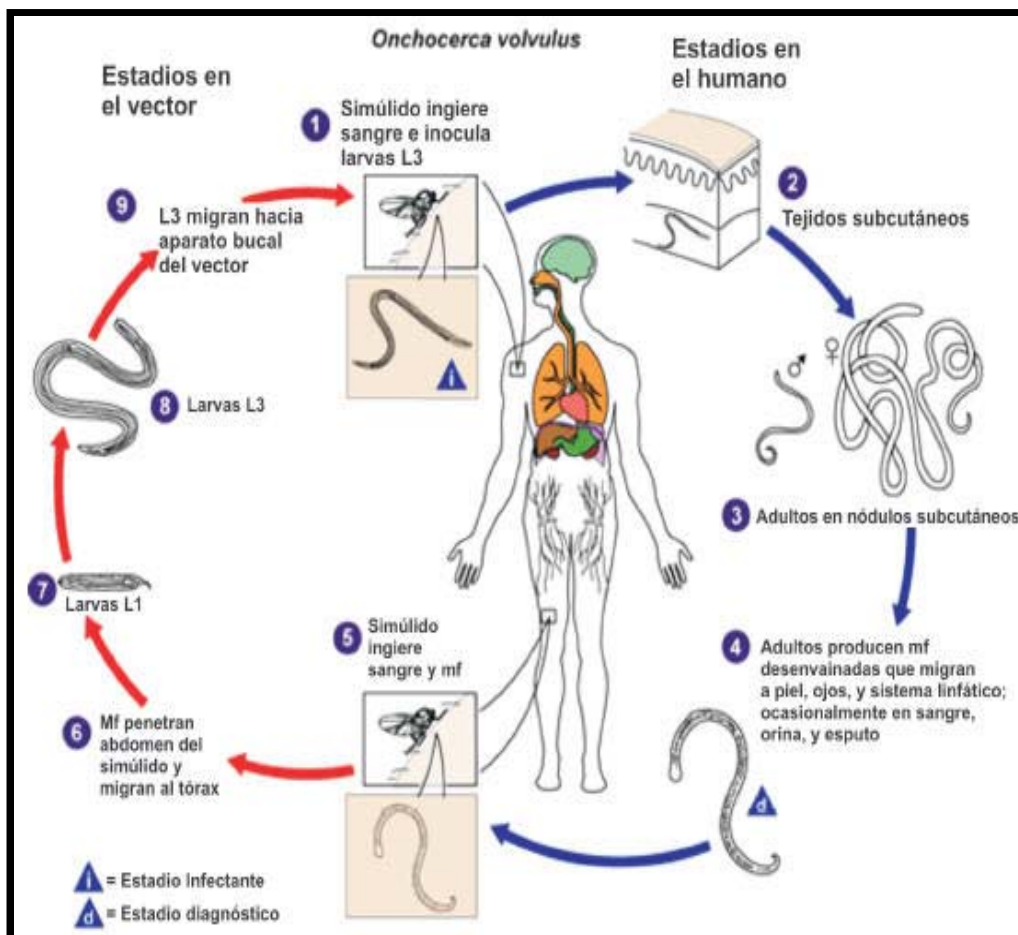


Figura 5. Ciclo vital de *O. volvulus* en el humano y en el vector.

Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Filariasis>. 2006.

2.7 La patología y manifestaciones clínicas producidas por la infección con *O. volvulus*

La infección con el parásito *O. volvulus* se inicia con el depósito de las microfilarias infecciosas en estadio L3s mediante la mordedura de los insectos hembras mientras se alimenta de sangre del hospedero (Ramírez-Pérez, 1977). 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 la ceguera (Hoerauf *et al.*, 2003).

2.7.1 Oncocercomas (nódulos subcutáneos)

Los nódulos u oncocercomas, por lo general, son masas cutáneas fibrosas, la mayoría son subcutáneos que se localizan en las prominencias óseas sobre la cabeza, el cinturón escapular y pélvica, costillas, trocánteres, rodillas y tobillos y dentro de ellos se encuentran encapsulados los gusanos o vermes adultos. La palpación del cuerpo durante el examen clínico permite detectar la presencia de nódulos característicos, que generalmente no producen dolor. Sin embargo, existe la creencia de que los nódulos en cabeza son factores de riesgo que pueden ocasionar daño ocular (Fuglsang y Anderson, 1977). Un nódulo contiene dos a tres gusanos hembras y un macho, por lo tanto, los gusanos machos adultos se mueven de un nódulo a otro para fecundar a las hembras. El número de nódulos en un mismo individuo varía de uno a seis, se observa en raras ocasiones hasta 24. En América Latina, la presencia de nódulos y las microfilarias en los enfermos se encuentran por lo general, en la cabeza y porción superior del torso, por lo que el riesgo que ocurran lesiones oculares y ceguera es mayor. En el continente de África, particularmente la localización de nódulos se encuentra generalmente en la cintura pelviana y las extremidades inferiores (Schulz-Key y Karma, 1986).

2.7.2 Manifestaciones dermatológicas (patología dérmica)

La patología dérmica de la oncocercosis resulta de una serie de mecanismos originados por el desplazamiento tisular de las microfilarias y de las secuelas resultantes de reacciones inflamatorias acumuladas. La patología puede ser clasificada, de acuerdo a la evolución de la enfermedad, en lesiones agudas o crónicas (Murdoch *et al.*, 1993). En los individuos afectados de México y Guatemala, se observan un ligero cambio en la pigmentación de la piel de la cara conocida como “erisipela de la costa” (Robles, 1919). El resultado de estos procesos repetitivos en individuos oncocercosos es la formación de una piel edematosa, con cambio en la coloración normal a una coloración morena verdosa o violácea, a este síntoma avanzado se le denomina “Mal Morado” (Hoerauf *et al.*, 2003). En los casos donde la enfermedad ha evolucionado, el tegumento cutáneo de la cara pierde elasticidad, provocando un arrugamiento exagerado de la piel, atrofia de la epidermis, piel en extremo delgada, colgante y brillante, despigmentación (piel de leopardo) y liquenificación de la piel, a esta fase se le denomina “Fascies Leonina” (Anderson *et al.*, 1974).

2.7.3 Manifestaciones oftalmológicas (patología ocular)

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. Las principales manifestaciones oculares son la presencia de microfilarias vivas en la cámara anterior y cornea, iridociclitis con desviación de la pupila, corioretinitis, atrofia del nervio óptico, glaucoma y catarata secundaria a oncocercosis. Es signo más importante en el segmento anterior de los globos oculares es la presencia de pequeñas opacidades que se localizan en el limbo nasal y temporal y que tienen la apariencia de copos de nieve; es conocido como “queratitis puntiforme” y es reversible. La “queratitis esclerosante” es una lesión irreversible, la cual parece ser el producto del desarrollo de lesiones de queratitis puntiforme (Figueroa, 1977; Rodríguez-Pérez y Rivas-Alcalá, 1991).

2.8 Métodos de diagnóstico de la oncocercosis en el huésped humano

2.8.1 Método Clínico

Este método es poco práctico, costoso, lento y requiere de personal altamente calificado. El método consiste en la identificación oftalmológica y la palpación o exploración física en la búsqueda de nódulos oncocercosos (Schlie-Guzmán *et al.*, 1989). El examen es realizado por un oftalmólogo especializado con adiestramiento para la identificación de microfilarias en la cámara anterior (CA) y queratitis puntiforme (QP) o por la exploración física general del individuo, para la detección de nódulos subcutáneos o lesiones dermatológicas. Este método es poco sensible, ya que no todos los gusanos adultos en el oncocercoma son accesibles a la palpación y no todos los gusanos adultos se encuentran formando nódulos (Nelson, 1970; Greene, 1984; Ottense, 1984).

2.8.2 Método Parasitológico

El diagnóstico de la oncocercosis se realiza principalmente por métodos parasitológicos, en particular a través de la detección de estadios de transmisión como son las microfilarias de *O. volvulus*, que se alojan principalmente en la piel del hospedero humano. Este método de diagnóstico ha sido una herramienta muy valiosa para monitorear el efecto del tratamiento de ivermectina sobre la prevalencia e intensidad de infección por mfs. El método de laboratorio consiste en la identificación del agente etiológico de la enfermedad mediante el examen microscópico de material fresco obtenidos por biopsia de piel superficial. La sensibilidad de la prueba es del 91.6% si se toman seis biopsias de piel en los lugares anatómicos adecuadas como son escápulas, regiones glúteas y piernas. Tiene la ventaja de ser un método cuantitativo, que determina la carga media de microfilarias de *O. volvulus* por miligramo de piel por cada individuo. Sin embargo, presenta serios problemas para ser utilizado en forma masiva, los valores predictivos de un resultado positivo son afectados si la prevalencia disminuye considerablemente (Grenne, 1984; Ottense, 1984).

2.8.3 Método Farmacológico

Este método se fundamenta en una prueba farmacológica clínica, conocida como “Reacción de Mazzotti” fue utilizada para la evaluación epidemiológica de la oncocercosis en México desde 1950 y 1980. La prueba está basada en la administración de 25 mg de citrato de dietilcarbamazina (DEC) por vía oral, o la aplicación en la piel de este medicamento que genera prurito característico. La interpretación es detectar signos y síntomas en el individuo como respuesta a la administración de medicamento (DEC). Sin embargo, es una prueba subjetiva y poco sensible, dando lugar a reacciones falsas positivas que pudieran sobreestimar la prevalencia y la incidencia de esta filariasis en las regiones donde se aplica. Otro inconveniente que tiene esta prueba es la de causar reacciones colaterales severas que puedan invalidar a los individuos bajo estudio y por lo tanto es la principal causa de rechazo de las poblaciones oncocercosas para someterse a esta prueba y para el tratamiento con esta droga (Greene, 1984; Ottense, 1984; Mazzoti, 1984).

2.8.4 Métodos Inmunológicos

Este método de diagnóstico está basado en la relación inmunológica entre los anticuerpos presentes en la sangre de los individuos oncocercosos y un antígeno especial preparado a partir del parásito *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). En general, el uso creciente de antígenos y la introducción de técnicas sumamente sensibles han provocado un significativo aumento de la sensibilidad y la especialidad, facilitando su aplicación tanto al diagnóstico de casos, como al control del tratamiento o al estudio epidemiológico de poblaciones (Kouemeni *et al.*, 1982; Klenk *et al.*, 1983).

2.8.5 Desarrollo de sondas de ADN y ensayos de PCR para el diagnóstico de la *O. volvulus*

Las investigaciones en el desarrollo de sondas de ADN y ensayos de PCR para el diagnóstico molecular de la oncocercosis iniciaron a mediados de los años 80's. Los esfuerzos para mejorar el diagnóstico han sido basados en la detección de anticuerpos anti-*O. volvulus* y en la detección de antígenos del parásito (Ayong *et al.*, 2005). Varias sondas de ADN de *Onchocerca* fueron aislados mediante el tamizaje de bibliotecas genómicas que se construyeron a partir de ADN genómico del parásito. Algunas de las sondas de ADN reconocieron todas las especies del género *Onchocerca* (Perler y Karam 1986; Shah *et al.*, 1987).

Sin embargo, dos sondas de ADN reconocieron de manera específica, a *O. volvulus* (Meredith *et al.*, 1989). Una fue específica para la variante del parásito de la selva, pFS-1 y otra para la variante de la sabana, pSS-1BT (Erttmann *et al.*, 1987; 1990). Estas sondas de ADN reconocen, de manera específica, a una familia de secuencias de ADN repetidas en tandém, con una unidad de repetición de longitud de 150 pares de bases presente en el genoma nuclear de *Onchocerca* (Zimmerman *et al.*, 1992). Estas secuencias repetidas fueron designadas como la familia O-150. Existen, aproximadamente 4,000 copias de la familia O-150 en el genoma haploide de *O. volvulus* (Meredith *et al.*, 1989).

En el transcurso de estas investigaciones, se desarrolló un ensayo de PCR que se utiliza para clasificar a los miembros del género *Onchocerca* (Meredith *et al.*, 1991; Zimmerman *et al.*, 1993). El método molecular incluye la amplificación por PCR de la familia de secuencia repetida O-150, seguida de una clasificación de los productos de PCR mediante hibridación a una variedad de sondas de ADN que son específicas para la especie y la forma del parásito. Debido a que este método puede detectar cualquier forma del parásito y de cualquier estudio de su ciclo de vida, su aplicación ha sido muy útil en el monitoreo de las infecciones, tanto en la población humana como en la del insecto vector. La detección de productos de PCR con la sonda de ADN puede realizarse por Southern blot ó ELISA (Unnasch y Meredith, 1996).

Existen varias aplicaciones prácticas derivadas del ensayo de la PCR con sondas de ADN de *O. volvulus*. El PCR fue usado para clasificar las extracciones de ADN del parásito a partir de larvas recolectadas en disecciones de simúlidos hechas por los entomólogos dentro del área del OCP en el África (Toé *et al.*, 1994; 1997a). La clasificación de las larvas encontradas en *S. damnosum* s.l. se realizó con el uso del PCR, a nivel de especie de *O. volvulus* y de sus dos variantes de la sabana y de la selva. Esto permitió obtener información más precisa acerca de los niveles de transmisión del parásito que produce la ceguera a través del área entera del OCP (Toé *et al.*, 1994).

Sin embargo, una desventaja del PCR fue que éste tuvo que aplicarse de manera individual para cada larva del parásito encontrada en los simúlidos que habían sido disecados por los entomólogos de campo. Por lo tanto, fue necesario desarrollar un nuevo ensayo de PCR capaz de detectar la infección con el parásito en un grupo de simúlidos. El nuevo ensayo de PCR fue capaz de detectar un simúlido infectado dentro de un grupo de 100 simúlidos sin infección. Además, el resultado obtenido por el PCR de grupos de simúlidos, requirió de ser interpretado mediante un modelo basado en algoritmos matemáticos. El resultado del tamizaje de grupos de simúlidos por PCR se ingresa a un programa matemático de computadora, el cual calcula la proporción de simúlidos con infección en la población total examinada por PCR (Katholi *et al.*, 1995).

El PCR y el programa matemático de computadora fueron validados bajo condiciones de campo en África y en México. En estos estudios se comparó el resultado que se obtuvo con el uso del método tradicional de detección de *O. volvulus* por la disección de un gran número de simúlidos, contra el obtenido con el uso de la PCR y el programa de computadora de Katholi (Yameógo *et al.*, 1999; Rodríguez-Pérez *et al.*, 1999c). El PCR y programa de Katholi fue utilizado en Ecuador en el primer estudio entomológico a gran escala, para determinar el impacto del programa con ivermectina (Guevara *et al.*, 2003). El segundo estudio entomológico con uso del PCR, a gran escala, se realizó en México (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004a). En estos estudios, los productos de PCR fueron detectados por ELISA (Unnasch y Meredith, 1996).

2.9 Programa para el control de la Oncocercosis en América Latina

La OMS considera a la oncocercosis como un problema de salud pública. Para ello, se ha considera como pilar del control de la oncocercosis a las medidas antivectoriales y antiparasitarias (ivermectina). Con el descubrimiento de ivermectina para el tratamiento de la oncocercosis, y su disposición en forma gratuita a través del Programa de donación de Mectizan (MDP), fue una adición importante a la estrategia del Programa de Control de Oncocercosis (OCP) (Thylefors, 2004). Para la distribución del medicamento se crearon dos programas de control: El Programa para el Control de la Oncocercosis en África (APOC) y el Programa para la de Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA) (Rodríguez-Pérez, 2005; Boatín y Richards, 2006).

Desde su inicio, el objetivo de APOC era el establecimiento de sistemas sustentables de Tratamientos Comunitarios con Ivermectina (CDTI), dentro de los 19 países mas afectados de África, fuera de la OCP en los que la oncocercosis sigue siendo un problema de salud pública (Remme, 2004). En América Latina en 1993, se implementó el programa OEPA, 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 (Blanks, 1998; IACO, 2001).

Desde su inicio la estrategia de OEPA consiste en apoyar a los programas nacionales, cuya única actividad de control es el tratamiento masivo con ivermectina de todas las comunidades endémicas. Para alcanzar estos objetivos, la estrategia actual de OEPA ha consistido en la distribución comunitaria de ivermectina dos veces por año con una cobertura no inferior al 85% de población elegible y por un período estimado en 14 años, el cual corresponde a la suma de la duración promedio de la vida reproductiva de la hembra adulta de *O. volvulus* más la longevidad de las microfilarias (Rodríguez-Pérez, 2005).

2.10 Control y eliminación de la oncocercosis en México

En México, la política de control de la oncocercosis, inició con la campaña de eliminación de gusanos adultos (nodulectomía) desde el año 1940. El tratamiento con agente microfilaricida (ivermectina) inició en el año 1989, siendo el primer objetivo el de aliviar las manifestaciones clínicas graves en las poblaciones humanas afectadas de los tres focos endémicos (Rodríguez-Pérez, 1994). Con el uso de estas medidas de control se ha logrado disminuir notablemente 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 han disminuido, de manera notable, la intensidad de transmisión (Rodríguez-Pérez y Rivas-Alcalá, 1991).

En teoría se considera que si se realizan tratamiento, a nivel masivo de ivermectina, con una cobertura mayor al 85%, se podría conducir a la supresión e interrupción de la transmisión, y de manera eventual, eliminar la enfermedad (Rodríguez-Pérez, 1994). Se ha sugerido, que el nivel en el cual se puede lograr la “supresión de la infectividad” es mediante una reducción mínima del 99% en relación a un potencial anual de transmisión de referencia donde se dispone de datos previos al tratamiento (WHO, 2001). Por lo tanto, se estima que en México la supresión e interrupción de la transmisión del parásito sólo será posible mediante el sostenimiento del programa con ivermectina a largo plazo, y por varios años (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004).

Se ha documentado que para el 2001, después de 17 rondas con ivermectina, el programa había tenido un impacto significativo sobre la supresión y la interrupción de la transmisión del parásito en las comunidades endémicas de Oaxaca y norte de Chiapas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). En general, es preciso realizar estudios epidemiológicos a profundidad para corroborar la eliminación de la oncocercosis en México basado en la medicación masiva con ivermectina, ya que se han establecido datos precisos que indican la supresión de la transmisión del parásito en los focos endémicos de México, que actualmente están recibiendo dos ó cuatro rondas de tratamiento con ivermectina por año (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

2.11 Tratamiento de la oncocercosis

La ivermectina es un producto semi-sintético, derivado de una lactona macrocíclica del actinomiceto *Streptomyces avermectilis* desarrollado por Merck y Co., Inc. Esta había sido implementada extensamente en medicina veterinaria para el tratamiento de parásitos (Campbell, 1991). En 1987 fue introducida por la OMS como tratamiento para la oncocercosis humana. En México, es ampliamente usada como tratamiento efectivo a nivel poblacional desde 1989 (Vande-Waa, 1991). Este fármaco es considerado hasta el momento como el más conveniente para el tratamiento de enfermedades tropicales, tiene una acción microfilaricida eficaz para eliminar las microfilarias en piel y evitar su liberación del útero de la hembra adulta (Awadzi, 1980; Baraka *et al.*, 1995b).

El fármaco actúa a nivel de los neurotransmisores del parásito (GABA), abriendo canales de cloro, ocasionando parálisis del parásito y logrando su muerte en 2-3 días. Este fármaco es efectivo contra microfilarias pero no contra las formas adultas. El esquema terapéutico con ivermectina consiste en una dosis oral de 150 µg/kg de peso, la droga es segura y reduce el número de microfilarias a niveles muy bajos por al menos un año con reacciones oftalmológicas mínimas (Dadzie *et al.*, 1987). Los criterios de exclusión para la administración de ivermectina incluyen: mujeres embarazadas, mujeres amamantando en la primera semana después del parto, niños menores de cinco años o con menos de 15 kg de peso y personas en malas condiciones de salud o con enfermedades del sistema nervioso central (Goa, 1991).

La utilización de este fármaco presenta efectos secundarios mínimos que son fácilmente manejables y su empleo ha hecho posible el tratamiento masivo de las comunidades endémicas. Los efectos adversos reportados con mayor frecuencia después de las primeras administraciones de ivermectina son: reacciones cutáneas, incluyendo prurito, dolores músculo-esqueléticos, fiebre, mialgias, escalofríos, hipotensión y edema de cara, articulaciones y miembros, dolores de cabeza y vértigo, linfadenopatía, y reacciones oculares. Estos efectos adversos de la ivermectina son normalmente leves y tolerables en los humanos (Zea-Flores *et al.*, 1992).

2.12 Cobertura con ivermectina en comunidades centinelas de México

El tratamiento para oncocercosis con ivermectina es un donativo vitalicio de la compañía farmacéutica Merck Sharp & Dohme Merck. Por esta razón, la ivermectina puede suministrarse a los individuos en las comunidades de forma gratuita y está plenamente asegurada para todos los países que lo requieran. El programa de oncocercosis en México inició el tratamiento con ivermectina en 1989, dando tratamiento sólo a los enfermos o casos de oncocercosis registradas por el programa. En la figura 6 muestra el panorama de la evolución con Mectizan. A partir de 1991 se inició la distribución anual, en todas las comunidades endémicas, principalmente en comunidades hiperendémicas. Por lo tanto, hasta el 2001 se habían aplicado 15 rondas de ivermectina en dosis semestrales, cubriendo una cobertura mayor de 85% en los tres focos endémicos (IACO, 2001; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004).

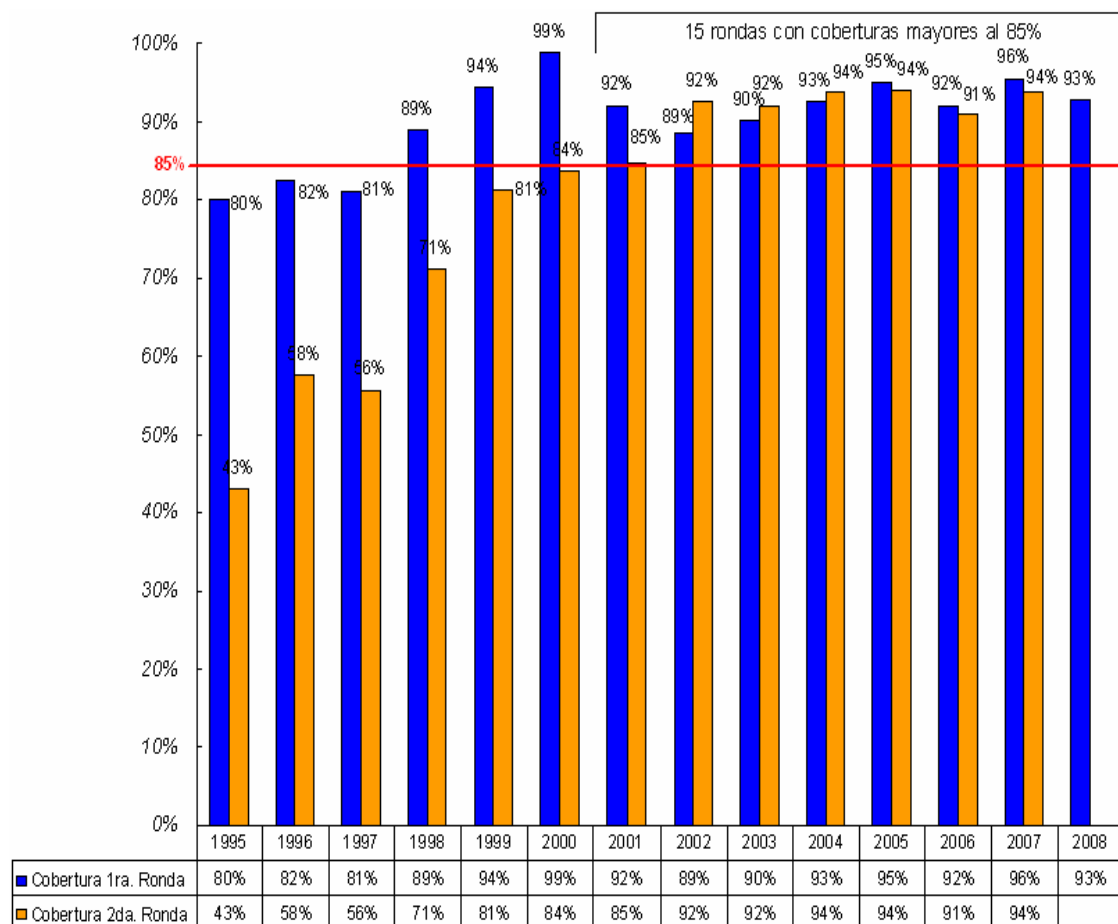


Figura 6. Evolución de tratamientos con Mectizan en México.

Fuente: OEPA (2008).

México ha logrado mantener coberturas mayores al 85%, desde la primera ronda 2001. En el foco sur de Chiapas, a partir del año 2003, la frecuencia de tratamientos con ivermectina se incrementó a cuatro rondas por año en 50 comunidades con el objetivo de acelerar el proceso de supresión e interrupción de la transmisión del parásito en estas comunidades. Asimismo, se ha reportado que en el año 2008, se inició la evaluación a profundidad para diagnosticar el progreso del programa ivermectina sobre la supresión e interrupción de la transmisión del parásito, en los tres focos endémicos de México (OEPA, 2008; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

El efecto de cuatro rondas de tratamiento por año sobre el parásito fue sugerido por Cupp *et al.*, (2004) mencionado que los tratamientos repetidos con ivermectina pueden tener efectos sobre la tasa de sobrevivencia y fecundidad de los gusanos hembras adultos. Estos resultados indican que al incrementar la frecuencia de tratamiento con ivermectina de dos a cuatro rondas por año puede ser una solución importante si se desea suprimir, de manera rápida, la transmisión de *O. volvulus* en áreas donde la transmisión persiste.

2.13 Monitoreo y evaluación de la transmisión de la oncocercosis

Tradicionalmente la detección de microfilarias en humanos se realiza mediante la detección de microfilarias en biopsias de piel (WHO, 1995), y la transmisión se determina mediante la disección individual al microscopio de hembras *S. ochraceum* s.l. Sin embargo, debido a que la ivermectina elimina las microfilarias de piel, es muy evidente, que la técnica de biopsia de piel ha sido cada vez menos útil en el monitoreo del programa ivermectina. A si mismo, la ivermectina ha demostrado un efecto significativo sobre los niveles de transmisión del parásito, la cual requiere disecar miles de simúlidos colectados, de manera simultánea, para poder evaluar su tasa de infección, lo que ha echo impráctico el método (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1995).

En México con el apoyo de OEPA, se ha establecido el Programa Nacional para la Eliminación de la Oncocercosis (PNEO), cuya misión es la de eliminar dicha enfermedad como una amenaza de salud pública, mediante la implementación de programas seguros y localmente sostenibles para la distribución de ivermectina (OEPA, 2005). Para llevar acabo la evaluación epidemiológica de este programa se requiere medir parámetros parasitológicos (detección de microfilarias en biopsia de piel y gusano adulto en nódulos), oftalmológicos (detección de microfilarias en cámara anterior y queratitis puntiforme) y los entomológicos (OMS, 1989).

Para ello, se han desarrollado métodos moleculares de diagnóstico que se utilizan en el monitoreo de los parámetros epidemiológicos (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). Estos incluyen la amplificación de ADN del parásito por PCR e identificación de dichos productos por medio de una técnica ELISA o Southern blot también se utilizan el inmunoensayo con antígenos recombinados para detectar anticuerpos anti-*O. volvulus* en población humana. Sin embargo, ha sido necesario calibrar y evaluar las pruebas moleculares de acuerdo a la situación epidemiológica específica de cada región (Guevara *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

En el área de operación del OEPA, por medio de la distribución masiva de ivermectina, ha sido tan efectivo que la oncocercosis está ya casi eliminada como problema de salud pública en América Latina. En México, el tratamiento semestral con ivermectina, ha dado buenos resultados ya que se ha documentado el impacto significativo sobre la supresión y la interrupción de la transmisión del parásito en todas las comunidades endémicas del Foco Oaxaca y Foco norte de Chiapas. Sin embargo, en algunas comunidades del foco sur de Chiapas la enfermedad aún persiste. Por lo tanto, es muy importante realizar estudios entomológicos que nos permitan concretar el avance hacia la interrupción de la enfermedad en este foco endémico (sur de Chiapas) de México (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

De acuerdo con lineamientos acordados por la OEPA y la OMS se considerará que se ha alcanzado la supresión de la transmisión en áreas donde no hay datos de pre-ivermectina (como Las Nubes II), cuando la prevalencia de moscas infectivas es menor 1/2,000 moscas (WHO, 2001); la supresión de la transmisión se ha establecido como ausencia ó casi ausencia de moscas infecciosas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008). En áreas donde existen datos pre-ivermectina (Las Golondrinas y Morelos), la supresión de la transmisión se define como una reducción del 99% con relación a un valor basal pre-determinado (OMS, 2001).

La detección de ADN del parásito en cuerpos de simúlidos es un indicador de la transmisión de microfilarias de piel hacia el insecto vector. Es importante tener en cuenta que el tamaño de muestra o número de cuerpos de *S. ochraceum s.l.* examinados debe de incrementarse conforme un programa de control va teniendo éxito. Los investigadores de la OEPA sugieren que un potencial de transmisión de entre 5 y 20 L3s/persona/año podría representar el “umbral” transmisión por debajo del cual la población de los parásitos ya no son capaces de auto-mantenerse. Por lo tanto, por debajo de este valor, la población del parásito podría difícilmente sobrevivir, conduciendo a la extinción del parásito aún y cuando se suspendieran las medidas de tratamiento para el control (WHO, 2007).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estimar el impacto que ha tenido la estrategia de múltiples tratamientos con ivermectina, en esquema trimestral, sobre la transmisión del parásito *O. volvulus* por *S. ochraceum* s.l. en tres comunidades del Foco sur de Chiapas.

4.2 Objetivos específicos

- 1.- Establecer, en el laboratorio, las condiciones óptimas para el proceso masivo de separación de cabezas y cuerpos de *S. ochraceum* s.l., así mismo, aplicar la técnica de extracción de ADN de lotes de 50 ejemplares de simúlido.
- 2.- Aplicar el ensayo de PCR-ELISA, para determinar la presencia o ausencia del ADN de *O. volvulus*, que fueron recolectados en los diferentes comunidades del presente estudio.
- 3.- Determinar la proporción de *S. ochraceum* s.l. infectados (análisis de cuerpos) e infecciosas (análisis de cabezas), y la tasa de transmisión estacional con un límite de confianza estadístico al 95%, utilizando el programa de Poolscreen.

5. HIPÓTESIS

En los últimos 5 años, habiéndose implementado el tratamiento masivo con ivermectina en esquema trimestral, esta estrategia podría acelerar el proceso de reducción ó supresión de la transmisión de *O. volvulus* por *S. ochraceum s.l.* en las tres comunidades estudiadas del Foco sur de Chiapas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de Estudio

El estudio entomológico fue realizado previamente al tratamiento con Mectizan®, en tres comunidades del foco sur de Chiapas: Las Golondrinas (15° 26' 06" N, 92° 39' 17" O, 920 msnm), Las Nubes II (15° 18' 09" N, 92° 28' 25" O, 1,080 msnm) y Morelos (15°14'00" N, 92° 30' 13" O, 1,020 msnm), las cuales se seleccionaron con base al registro de casos humanos; las mismas tienen un seguimiento especial a través de la realización periódica de una evaluación epidemiológica en profundidad.

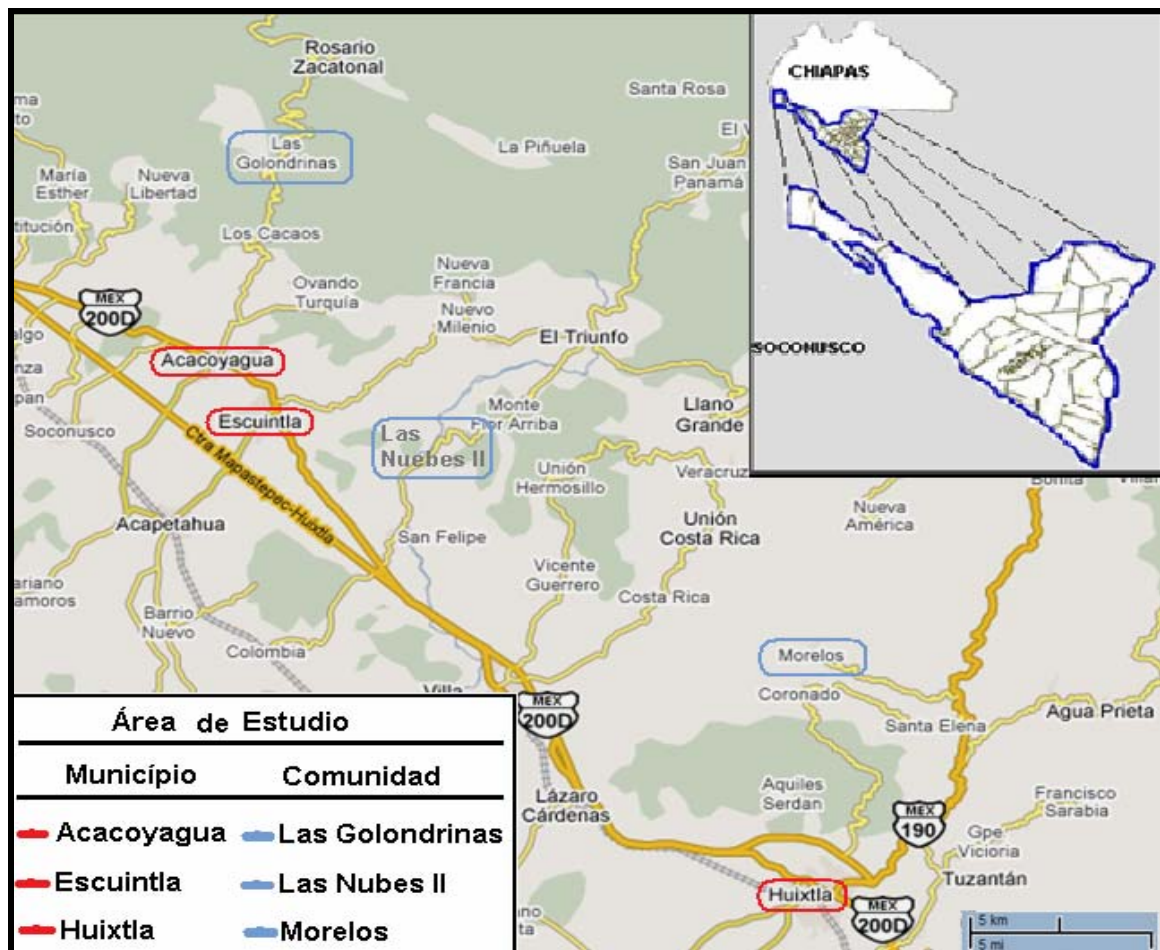


Figura 7. Ubicación de las comunidades analizadas en este trabajo. En el mapa se muestra los municipios donde se encuentran ubicadas las comunidades donde se recolectaron los ejemplares de *S. ochraceum s.l.*

6.2 Estrategia utilizada para el estudio entomológico

Para estimar la transmisión se analizaron los lotes de cuerpos de los simúlidos de cada comunidad por PCR y detectando el ADN del parásito por medio del inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). De acuerdo a los resultados obtenidos, si un lote de cuerpos de simúlidos resultó positivo a PCR-ELISA, se paraba el análisis de cuerpos de los simúlidos y se llevaba a cabo el análisis de todas las cabezas de simúlidos recogidos de tal comunidad para determinar la Tasa de Infektividad. Por otro lado, si todos los lotes de cuerpos de simúlidos de una comunidad determinada resultaban negativos, entonces se asume que todas las cabezas también están libres de infección y, por lo tanto, los lotes de cabezas de simúlidos ya no eran examinados. Las estrategias aplicadas en este estudio han sido ampliamente descritos por Rodríguez-Pérez *et al.*, (2004), donde los cuerpos y las cabezas de los simúlidos fueron agrupados por lotes de 50 simúlidos cada uno y se analizaron por PCR-ELISA, obteniendo como resultado la prevalencia de infección parasitaria mayor, estadísticamente, que la prevalencia de inefektividad, por lo tanto, el índice de cuerpos positivos a PCR es un indicador más sensible de la trasmisión.

6.3 Recolecta de los simúlidos

Para llevar acabo éste estudio entomológico se seleccionaron dos hábitats para la captura rutinaria de simúlidos: uno en el centro de la comunidad y otro en un cafetal. Para la comunidad de “Las Golondrinas” los simúlidos fueron capturados en los meses de enero a marzo del 2008 y para el caso de “Las Nubes II” y “Morelos” las capturas se realizaron en el mes de diciembre de 2007 a marzo de 2008, siguiendo procedimientos descritos por Rodríguez-Pérez *et al.*, (1999); Rodríguez-Pérez y Rodríguez-López (1994); Rodríguez-Pérez y Reyes-Villanueva (1994). Para la recolecta de adultos hembras de simúlidos se realizó con la participación de cuatro personas voluntarios residentes de la comunidad afectada. Un par de ellos actuó como recolector, mientras que el otro par actuó como atrayente (cebo humano). A los participantes se les administró una dosis de ivermectina una semana antes de la captura de los simúlidos.

La colecta 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. El colector de simúlidos aspiró todos los ejemplares de simúlidos que se pasaron en la piel expuesta del atrayente (hombre) antes de que estos comenzaran su alimentación sanguínea. Los ejemplares de simúlidos capturados se colocaron en diferentes recipientes según la hora de captura, se etiquetaron con el nombre de la comunidad, la fecha, el, el sitio de captura y el nombre del equipo de los colectores. Los simúlidos fueron conservados en alcohol isopropílico a temperatura ambiente y posteriormente fueron separados por especie en el laboratorio de acuerdo, a su morfología y, los simúlidos de otras especies: *S. callidum* y *S. metallicum* s.l etc., que se colectaron de manera simultánea junto con el *S. ochraceum* s.l. se excluyeron de este estudio. Los lotes de *S. ochraceum* s.l. fueron divididos en alícuotas de 50 ejemplares cada uno y se mantuvo a 4°C para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Biotecnología Animal II del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, ubicado en Reynosa, Tamaulipas, México.

6.4 Separación de cabezas y cuerpos de los simúlidos

Para el proceso de separación de cabezas y cuerpos, se eliminó el alcohol isopropílico que mantenía conservados a los simúlidos; enseguida se lavaron tres veces en etanol al 95% y se dejaron secar por medio de evaporación. Los simúlidos secos fueron transferidos a un tubo de 2.0 ml para crio-preservación. En un tubo de plástico Falcón de 50 ml se introdujeron a presión cinco de los tubos para crio-preservación y se colocó en nitrógeno líquido por 30 minutos, luego el tubo fue abierto para liberar la presión ejercida por la baja temperatura. Los tubos se agitaron, de manera vigorosa y, se golpearon contra una superficie de cemento para separar las cabezas de los cuerpos (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). Las cabezas se separaron de los cuerpos por medio de un tamiz de 0.25 mm. Previamente, se colocaron de manera separadas las cabezas y cuerpos en tubos de microcentrifugación de 1.5 ml, para ser procesadas de manera independiente (Guevara *et al.*, 2003).

6.5 Extracción del ADN genómico

La extracción de ADN se realizó, de manera independiente, a partir de la preparación de lotes de cuerpos y cabezas de *S. ochraceum* s.l. (cada lote conformado por 50 cuerpos o cabezas cada uno). Los grupos de cabezas y cuerpos de las simúlidos fueron macerados de manera independiente en una concentración de 400 μ l de solución de homogenización (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.1% SDS), 2 μ l de ADN de esperma de salmón (250 ng/ μ l) y Proteinasa K (400 μ l/ml). Para digerir las proteínas del homogenizado, éste fue incubado a 55°C por una hora. El homogenizado fue incubado otras veces a 100 ° C por 30 minutos en presencia de 4 μ l de 1M DTT para romper la cutícula del parásito seguido de una serie de pasos de congelamiento y deshiele para liberar el ADN del parásito. Siguiendo con el proceso, se realizó la extracción de ADN de los tejidos de los simúlidos y del ADN del parásito con 400 μ l de fenol-cloroformo (1/1 v/v) en dos ocasiones, seguida de una extracción con cloroformo.

6.6 Purificación del ADN

En paralelo al ensayo de cada grupo de muestras, se realizaron “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 controles de negativo interno. A la capa acuosa de la extracción final fue transferida a un pozo de una placa de microfiltración (Whatman GF/B) de 96 pozos en una solución final de 50 μ L, se le añadieron tres volúmenes de solución de NaI, enseguida se incubó a 4°C por 15 minutos. En esta placa se realizó la purificación del ADN con dos rondas de absorción previamente con lavado de etanol (Unnasch, 2005). El ADN fue ELUÍDO de la placa de microfiltración con un volumen final de 50 μ L de agua miliQ estéril mantenida a 55°C., enseguida se centrifugó a 3000 RPM por 1 minuto y el extracto final almacenado a -20°C para su uso posterior.

6.7 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. En la amplificación se utilizó como molde para la reacción de PCR, 3 μ l del preparado de ADN purificado dentro de un volumen total de 50 μ l que contuvo una concentración final de 20 μ M del iniciador 1632 (5' GATTYTTCCGRCGAANARCGC 3') y 20 μ M del iniciador 1633 (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.

Las condiciones del ensayo de PCR fueron las siguientes:

1) la concentración de solutos en la mezcla de PCR consistió en: 5.0 μ l buffer 5X PCR (300 mM Tris-HCl (pH 9.0), 75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM MgCl_2), 2 mM para cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dTTP y 1.25 U/ μ l Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN); y, 2) cada reacción de PCR consistió de 5 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 37°C y 30 segundos a 72°C, seguido por 35 ciclos de amplificación de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 37°C y 30 segundos a 72°C. La reacción se completó por la incubación a 72°C por 6 minutos. La hilera A de la placa de microtitulación fue reservada para colocar 10 controles negativos y dos controles positivos. En uno de los controles positivos del PCR se colocó 1.0 μ l de la cantidad mínima de ADN del parásito (ADN del pOVS134 purificado) mezclado con 2 μ l de agua de PCR; dicha cantidad mínima 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 1.0 μ l de la misma cantidad mínima de ADN del parásito mezclado con 1.5 μ 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.

6.8 Detección de productos de PCR por ELISA y su interpretación.

El procedimiento de ELISA para detectar productos de PCR O-150, ha sido descrito por varios autores (Unnasch y Meredith, 1996; Nutman *et al.*, 1994; Guevara *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). Siendo establecido de la siguiente manera: el 10% de cada producto de PCR (5 μ l) se colocó en un pozo de la placa de microtitulación que contuvo estreptavidina (1 μ 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 50 μ l de sonda u oligonucleótido específico para *O. volvulus* marcada con fluoresceína (OVS2: 5' AATCTCAAAAACGGGTACATA-FL 3'); la sonda OVS2 con fluoresceína fue detectada añadiendo 1 μ l de 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 25 μ l de solución de ácido sulfúrico (0.3M H₂SO₄) y las placas se colocaron en una lectora ELISA a 450 nm. Enseguida 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 nuestro verdadero positivo fue siempre mayor que 0.2; de esta manera, se redujo el número de falsos positivos y tuvimos ensayos más limpios. Cualquier muestra 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. La muestra de ADN del positivo provisional fue identificada y se repitió en ensayo de PCR-ELISA. Sólo la muestra que resultó ser positiva en dos reacciones independientes de PCR-ELISA fue considerada como verdadera positiva.

6.9 Análisis de datos

Para el análisis de los resultados de PCR se seleccionaron tres parámetros entomológicos: 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. Para obtener estos resultados se empleó el programa de algoritmo “Poolscreen®” (Katholi *et al.*, 1995), calculando ambas proporciones de infección y el intervalo de confianza (IC) superior e inferior pre-seleccionado (en este estudio fue del 95%). Los estimados en los cuales los intervalos no se sobrepone fueron considerados como diferentes, a un valor de probabilidad estadística de $P < 0.05$ (Korin, 1977). La descripción del modelo “Poolscreen®” de Katholi *et al.*, (1995) se encuentra reportado y descrito por Davies *et al.*, (1998) y Guevara *et al.*, (2003). En resumen, el algoritmo de Katholi estimó la proporción \pm IC de infección de una muestra poblacional de simúlidos ensayados por PCR a partir de: A) el número de lotes de simúlidos que resultaron positivos en el PCR; B) el número de lotes de simúlidos ensayados por PCR; y C) el tamaño del lote de los simúlidos (fue de 50). Finalmente, la proporción de infección parasitaria y de infectividad se expresó en una tasa por cada 2,000 simúlidos; 3) Se calculó el potencial de transmisión estacional (PT). Sin embargo, como no se recolectaron simúlidos durante todo el año, no fue posible calcular el potencial de transmisión anual (PTA). Por lo tanto, es probable que en aquellos meses del año que no corresponden con el período de máxima transmisión (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 nivel de transmisión estimada durante el pico de mayor transmisión es muy bajo (debido al efecto de múltiples rondas de tratamiento con ivermectina). Por lo tanto, el valor del potencial de transmisión fuera del pico de transmisión es probablemente de cero o cercano a cero. De esta manera, el potencial de transmisión estacional (valor estimado sólo en la estación de máxima transmisión) puede representar un buen estimador del PTA.

El potencial de transmisión estacional (PT) fue calculado del producto de la tasa picadura/hombre por periodo, siendo la proporción de moscas infectadas (L3) en la estación en estudio (diciembre de 2007 a marzo de 2008) siguiendo métodos establecidos por Rodríguez-Pérez *et al.*, (2006). La tasa de picadura estacional se calculó como el producto de la media geométrica de Williams 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, Fernández-Salas *et al.*, 1994) 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; 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; Grillet *et al.*, 2001).

En América Latina, la tasa de paridad de los simúlidos podría estar alrededor del 50%, por lo que se adoptó el criterio de 1 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.

7. RESULTADOS

7.1 Estudio entomológico y obtención de la tasa de picadura

En total, se recolectaron 36,279 ejemplares de *S. ochraceum s.l.* en las comunidades del foco sur de Chiapas: Las Golondrinas, Las Nubes II y Morelos, el número de simúlidos capturados por comunidad se presenta en el cuadro 2. Es importante, resaltar que con los datos obtenidos del número total de simúlidos capturados, así como el número de días de captura fue calculada la tasa de picadura/hombre/periodo (ver cuadro 2).

Cuadro 2. Total de ejemplares de *S. ochraceum s.l.* recolectados y la tasa de picadura/hombre por periodo, de las tres comunidades del foco sur de Chiapas, México.

Foco/Comunidad centinela	No. días de captura	No. total de ejemplares de <i>S. ochraceum s.l.</i> recolectados	Tasa de picadura/Hombre por periodo
Las Golondrinas ¹	9	11,221	81701.36109
Las Nubes II ²	14	12,148	83237.49688
Morelos ²	10	12,910	102020.1006

* 1= Extra-centinela

* 2= Centinela

De los 36,279 ejemplares de *S. ochraceum s.l.* recolectada en las tres comunidades de este estudio, fueron ordenados en lotes de 50 ejemplares cada uno, por lo tanto se separaron 790 lotes de simúlidos (50 ejemplares c/u). Todos fueron sometidos a ruptura mecánica para separar cabezas y cuerpos, posteriormente se les extrajo el ADN para su amplificación por PCR, seguido de la detección de productos de PCR por ELISA. Los 790 lotes de simúlidos se convirtieron en 1,580 lotes de 50 cuerpos y cabezas cada uno. En el cuadro 3, se presenta el total de simúlidos analizados por PCR.

7.2 Detección de productos de PCR por ELISA y su interpretación

Para la comunidad Las Golondrinas se analizaron 254 lotes (50 cuerpos c/u) y 294 lotes (50 cuerpos c/u) para Las Nubes II, donde no se encontraron reacciones positivas a la fase de infección del parásito (L1, L2 y L3 en desarrollo en cuerpo de los simúlidos) indicando la ausencia de *O. volvulus*, por lo tanto de acuerdo con la estrategia descrita en la sección 6.2, ya no se prosiguió en el análisis de cabezas asumiendo que todos los lotes eran negativos. Para la comunidad Morelos se analizaron 84 lotes (50 cuerpos c/u) donde se presentaron dos reacciones de cuerpos positivos indicando la presencia de *O. volvulus*, los cuales se tuvieron que analizar por duplicado (84 lotes de cuerpos), en donde, pudimos confirmar la presencia del parásito. En la figura 8, se presenta las reacciones positivas de cuerpos que se detectaron por PCR-ELISA para la comunidad de Morelos. Enseguida se procedió a analizar los 242 lotes (50 cabezas c/u) de esta comunidad donde no se encontró ninguna reacción positiva al parásito. En el cuadro 3, se presenta el total de simúlidos analizados por PCR.

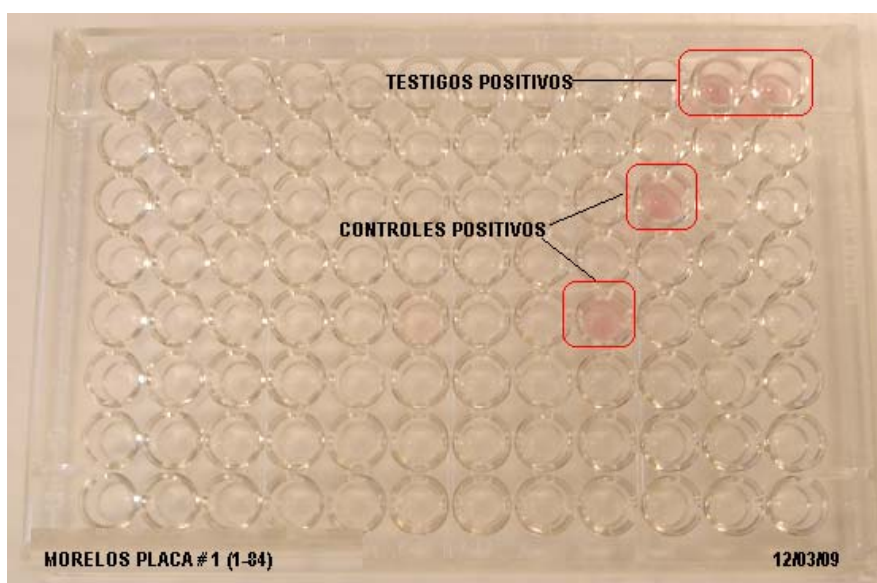


Figura 8. Detección de productos de PCR con las sonda OVS2 por ELISA. Reacciones positivas por PCR-ELISA de cuerpos procedentes de la comunidad Morelos.

Cuadro 3. Número de lotes de cabezas y cuerpos de simúlidos analizados por PCR y detección de productos de PCR por ELISA.

Foco/Comunidad centinela	No. de lotes <i>S. ochraceum</i> s.l. obtenidos	Lotes analizados (cuerpos)	Lotes positivos (cuerpos)	Lotes analizados (cabezas)	Lotes positivos (cabezas)
Las Golondrinas	254	254	0	0	0
Las Nubes II	294	294	0	0	0
Morelos	242	84	2	242	0

* 0 = No se analizaron, se asume que se encuentran negativos.

7.3 Análisis de los datos mediante el programa de algoritmo “Poolscreen”

En total se amplificaron por PCR 632 lotes de cuerpos de *S. ochraceum* s.l., dos resultaron positivos, procedentes de la comunidad Morelos, dando una tasa de infección parasitaria total de 0.41/2,000 (IC-95%= 0.024 – 0.92). Por lo que se analizaron 242 lotes de cabezas para la comunidad Morelos dando una tasa de infectividad de cero (Ls 95%= 0.31) y el potencial de transmisión estacional fue de cero (Ls 95%= 15.81). Debido a que la comunidad Las Golondrinas y Las Nubes II no presentaron manifestaciones a la fase de infección de parásito, en este caso se asumió que la proporción de hembras infecciosas es cero, por lo tanto, se asumió que el PT también es cercano a cero. En el cuadro 4, se presentan los resultados globales del análisis estadístico de las tres comunidades estudiado.

Cuadro 4. Tasa de Infección/Infectividad y potencial de transmisión de *O. volvulus* por *S. ochraceum* s.l. para las comunidades estudiadas del foco sur de Chiapas, México.

Foco/Comunidad centinela	Lotes positivos (cuerpos)	Lotes positivos (cabezas)	TIP ±95% -I.C	TI ±95% -I.C	Potencial de Transmisión
Las Golondrinas	0	0	0 (Ls= 0.30)	0	0
Las Nubes II	0	0	0 (Ls= 0.26)	0	0
Morelos	2	0	0.41 (0.024-0.92)	0 (Ls= 0.31)	0 (Ls=15.81)

* Tasa por 2,000 simúlidos paras IC al 95%

La comunidad Morelos presentó una tasa de infección parasitaria de 0.41/2,000 (IC-95%= 0.024 – 0.092), esta fue más alto numéricamente que la estimada en la comunidad Las Golondrinas y Las Nubes II, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa debido al amplio rango de intervalo de confianza al 95% que rodea al estimado de prevalencia de infección para las tres comunidades. Sin embargo, el límite superior para Morelos es mayor que para el resto de las comunidades por que el número de muestras es menor. En la figura 9, se presenta una grafica que compara los resultados estadísticos de la tasa de infeccción en las tres comunidades de estudio.

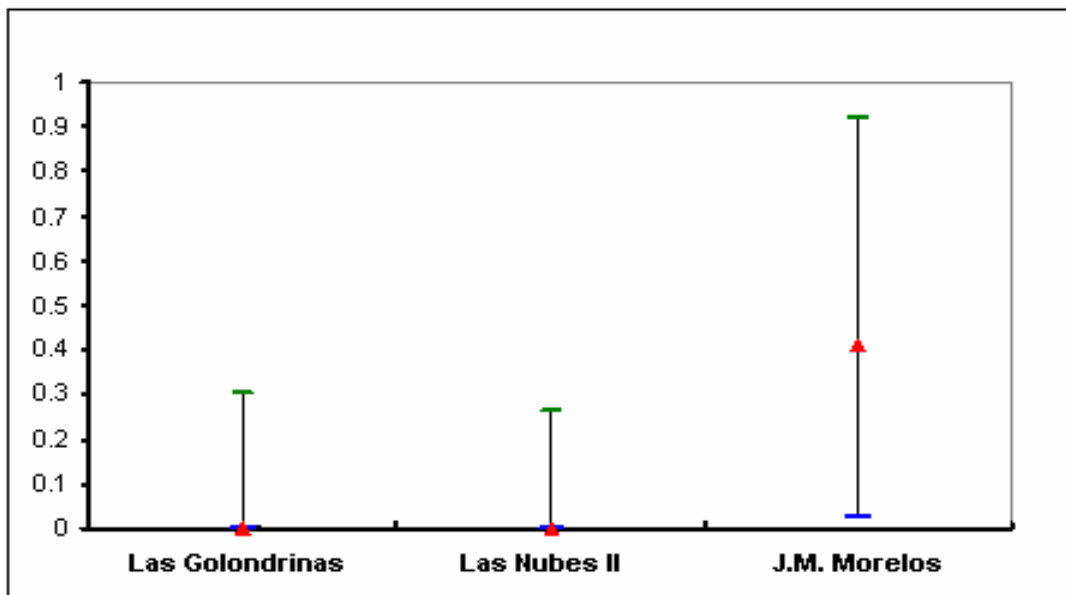


Figura 9. Tasa de infección parasitaria (tasa por 2,000 simúlidos paridos) de *O. volvulus* por *S. ochraceum* s.l. en las tres comunidades del foco sur de Chiapas.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo donde se utilizó el ensayo de PCR-ELISA para estimar la transmisión del parásito *O. volvulus* por *S. ochraceum* s.l., muestra la evolución epidemiológica del monitoreo del impacto del programa de tratamiento con ivermectina sobre la transmisión en tres comunidades del foco sur de Chiapas. Los resultados de esta investigación son de gran importancia para la Secretaría de Salud de México, ya que se sugiere la interrupción de la transmisión del parásito de la oncocercosis en el foco sur de Chiapas a partir de un programa basado en una alta tasa de cobertura con ivermectina en dosis trimestrales como nueva estrategia para lograr mayor efectividad en áreas problemáticas como es el caso del foco sur de Chiapas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

Debido a que el tratamiento con ivermectina altera la distribución y carga de microfilarias en piel de la población humana y, por lo tanto, la tasa de microfilarias ingeridas por el simúlido durante su alimentación, se ha sugerido que uno de los parámetros entomológicos, para medir el impacto de la ivermectina sobre la transmisión, se estime a partir de la detección de cualquier estadio larval del parásito (L1, L2 y L3) en cuerpos de *S. ochraceum* s.l. (TIP), y también se estime a partir de la detección de las larvas L3s en cabeza (TI) (Basáñez *et al.*, 1995; Basáñez *et al.*, 1998). De modo tal que, un cambio en la TIP reflejaría, de manera más directa, el nivel de aceptación y cobertura con ivermectina (Cupp *et al.*, 1992).

En los países de América Latina coordinados por el programa para la eliminación de la oncocercosis (OEPA), el método de PCR-ELISA es una herramienta útil para el estudio a gran escala de la población de *Simulium spp* ya que permite realizar un seguimiento anual de los índices de infección y de transmisión del parásito de la oncocercosis en las áreas endémicas donde se aplica el tratamiento masivo con Mectizan®. Esta metodología permite predecir con exactitud el número de individuos infectados en una población de vectores, siendo de gran importancia su aplicación en áreas donde se han aplicado medidas de control y por lo tanto la tasa de infección es baja (Yameogo *et al.*, 1999; Guevara *et al.*, 2003; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004).

Debido a que no se dispone de datos entomológicos pre-ivermectina en la comunidad Las Nubes II, no fue posible cuantificar de manera precisa el efecto del tratamiento con ivermectina sobre la transmisión del parásito. Sin embargo, el criterio que estableció la OMS para indicar la supresión e interrupción de la transmisión del parásito donde no se dispone de información pre-ivermectina, fue una TI de menos de un simúlido con larvas L3s en cabeza por cada 2,000 simúlidos (OMS, 2001 y OEPA, 2008). Como no encontramos presencia de larvas (L1, L2 y L3) en cuerpos de *S. ochraceum* s.l., no realizamos el análisis de cabezas, asumiendo que los lotes estaban libres de infección con larvas L3s. Es posible inferir que la transmisión del parásito en Las Nubes II está suprimida, debido a que los límites superiores del IC de la TI están por debajo del umbral fijado por la OMS y OEPA que es menos de 1/2,000 moscas estudiados.

Debido a que se disponen de datos entomológicos pre-ivermectina en las comunidades de Las Golondrinas y Morelos, aquí sí fue posible cuantificar el efecto de ivermectina sobre la transmisión del parásito. En el estudio entomológico de Las Golondrinas, en el año de 1991 se practicó la disección de 11,900 *S. ochraceum* s.l. para estimar el potencial de transmisión del parásito antes de iniciar el tratamiento con ivermectina (Rodríguez-Pérez *et al.*, 1995). Asimismo, en el año de 1980 y 1981 en Morelos se practicó la disección de 6,819 *S. ochraceum* s.l., para estimar el potencial de transmisión del parásito (Ortega *et al.*, 1992).

Para el año 2001, a partir del análisis de cabezas por PCR llevada a cabo en ambas comunidades protegidas con 17 rondas con ivermectina, se encontró una reducción sobre el valor pre-ivermectina del 95%: en Las Golondrinas el potencial de transmisión pasó de 19.03 a 1.01 L3s por persona, antes y después del tratamiento con ivermectina, respectivamente y, en Morelos de 19.8 a 0.82 L3s por persona (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004). Por lo tanto, en comparación con nuestros resultados obtenidos en el 2009 mediante la técnica PCR-ELISA, pudimos observar una reducción sobre el valor pre-ivermectina del 99%: en Las Golondrinas el potencial de transmisión pasó de 1.46 a 0 L3s por

persona, antes y después del tratamiento con ivermectina, respectivamente, y en Morelos de 1.30 a 0 L3s por persona.

De acuerdo al criterio establecido por OMS, en comunidades donde existen datos pre-ivermectina, la supresión se define como un reducción del 99% del potencial de transmisión en relación a un valor basal predeterminado (OMS, 2003). Por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados obtenidos afirmamos que la transmisión del parásito en las dos comunidades ya está suprimida. Lo que indica que el nivel de aceptación y cobertura con ivermectina en estas comunidades fue muy alto, ya que no hubo microfilarias de piel disponibles para la transmisión hacia las poblaciones de *S. ochraceum* s.l.

Aunque, los resultados indican que la transmisión está suprimida en las comunidades de este estudio, debido a la implementación estratégica de dosis trimestral con ivermectina, esta supresión de transmisión no significa que se haya logrado una interrupción permanente de la transmisión. Por lo tanto, es necesario mantener las actividades de control hasta asegurarse de que no ocurrirá un retorno de la transmisión. Para confirmar la supresión total de la enfermedad se requiere nuevos estudios de monitoreo de la transmisión para asegurarnos que la oncocercosis se ha eliminado de las comunidades afectadas.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, los datos presentados en esta investigación demuestran una clara reducción de la transmisión de *O. volvulus* por *S. ochraceum* s.l, lo que indica que el programa para la eliminación de la oncocercosis en México ha tenido un impacto significativo sobre la interrupción de la transmisión del parásito en el foco sur de Chiapas. En este estudio no encontramos evidencia de transmisión del parásito en dos de las tres comunidades investigadas. Igualmente en aquella comunidad donde si encontramos contacto evidente entre la microfilaria y el vector, al realizar el análisis de las cabezas, todos resultaron ser negativas, por lo tanto el potencial de transmisión fue cero. En general, se cumple con el criterio entomológico propuesto por la OMS y OEPA que definen la supresión de la transmisión, si dicha tasa de transmisión es menor de 1 hembra infecciosa por cada 2,000 moscas en donde no existen datos previos del tratamiento con ivermectina (es decir, Las Nubes II). De manera similar, en las comunidades donde existen datos previos al tratamiento con ivermectina (Las Golondrinas y Morelos), la reducción de la transmisión fue significativa y por debajo del valor conservador del 99% de la reducción recomendada por la OMS como el criterio de la supresión de la transmisión. Es necesario mantener las actividades de control y realizar estudios entomológicos adicionales de monitoreo de la transmisión del parásito en el foco sur de Chiapas para confirmar que la transmisión ha sido interrumpida.

10. LITERATURA CITADA

- Anderson J., Fuglsang H.P., Hamilton J.S. and Marshall T.S. 1974. Studies on onchocerciasis in the United Cameroon Republic I. Comparison of populations with and without *Onchocerca volvulus*. Trans. R. Soc. Tropical Medicine Hyg. 68:190-208.
- Albiez E.J., Buttner D.W. and Duke B.O.L. 1998. Diagnosis and extirpation of nodules in human onchocerciasis. Tropical Medicine Parasitology. 39(4):331-346.
- Awadzi K. 1980. The chemotherapy of onchocerciasis II. Quantitation of the clinical reaction to microfilaricides. Annals of Tropical Medicine and parasitology. 74: 189-197.
- Ayong L.S., Tume C.B., Wembe F.E., Simo G., Asonganyi T., Lando G. and Ngu J.L. 2005. Development and evaluation of an antigen detection dipstick assay for the diagnosis of human onchocerciasis. Tropical Medicine International Health. 10:228-233.
- Basáñez M.G., Remme J.H., Alley E.S., Bain O., Shelley A.J., Medley G.F. y Anderson R.M. 1995. Density-dependent processes in the transmission of human onchocerciasis: relationship between the numbers of microfilaria e ingested and successful larval development in the simuliid vector. Parasitology. 110:409-427.
- Basáñez M.G., Yarzabal L., Takaoka H., Suzuki H., Noda S. and Tada I. 1998. The vectorial role of several blackfly species (Diptera: Simuliidae) in relation to human onchocerciasis in the Sierra Parima and Upper Orinoco regions of Venezuela. Annals Tropical Medicine Parasitology, 82: 597-611.
- Barrera J.F y López B. 1996. Entomología general. El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, México. 250pp.
- Baraka O.Z., Mahmoud B.M., Ali M.H., Sheikh E.A., Homeida M.M., Mackenzie C.D. and Williams J.F. 1995b. Ivermectin treatment in severe asymmetric reactive onchodermatitis (sowda) in Sudan. Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89:312-315.

- Biagi F. 1993. Enfermedades Parasitarias. Tercera Edición. Prensa Médica Mexicana, S.A. de C.V. México 279-281 pp.
- Boatin B.A., F.O. Richards. 2006. Control of Onchocerciasis. *Adv Parasitol.* 61: 349-94.
- Blanks J., Richards F., Beltrán F., Collins R., Álvarez E. and Zea-Flores G. 1998. The Onchocerciasis Elimination Program for the Americas: a history of partnership. *Pan Am. J. Public Health.* 3: 367–374.
- Campbell, W.C. 1991. Ivermectin as an antiparasitic agent for use in humans. *Annual Review of Microbiology.* 45, 445-474.
- Cupp E.W., Duke B.O.L., Mackenzie C.D., Guzmán J.R., Vieira J. C. and Méndez-Galván J. 2004. The effects of long-term community level treatment with ivermectin (Mectizan) on adult *Onchocerca volvulus* in Latin America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 602–607.
- Cupp, E.W., Ochoa, J.O., Collins, R.C., González-Peralta, C., Castro, J. y Zea-Flores, G. 1992. The effects of repetitive community-wide ivermectin treatment on transmission of *Onchocerca volvulus* in Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 47:170-180.
- Chávez N.M. 1979. Epidemiología de la oncocercosis en México. *Salud Pública de México.* 31: 707-717.
- Cheke R.A. 1995. Cycles in daily catches of members of the *Simulium damnosum*. *Annual Review of Microbiology.* 46, 247-252.
- Dadzie K., Bird A.C., Awadzi K., Schulz K.H., Gilles H.M. and Aziz M.A. 1987. "Ocular findings in a double-blind study of ivermectin versus diethylcarbamazine versus placebo in the treatment of onchocerciasis". *Br. J. Ophthalmology.* 71: 78–85.
- Davies J.B., Oskam R., Lujan G.J., Schoone C.C., Kroon L.A., López M. and Paniagua A. 1998. Detección de *Onchocerca volvulus* DNA in pools of wild-caught *Simulium ochraceum* by use of the polimerase chain reaction. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.* 92: 295-304.

- Davies J.B. & Crosskey R.W. 1991. *Simulium* vectors of onchocerciasis in World Health Organization. Vector control series: *Simulium* Training and Information Guide. WHO/VBC. 115 pp.
- Duke B.O.L. 1968. Studies on factors influencing the transmission of onchocerciasis. IV. The biting-cycles, infective biting density and transmission potential of "forest" *Simulium* *damnosum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 62: 95-106.
- Duke B.O.L. 1993. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Tropical Medicine Parasitology*. 44:61-68.
- Erttmann K.D., Meredith S.E., Greene B.M. and Unnasch T.R. 1990. Isolation and characterization of form specific DNA sequences of *Onchocerca volvulus*. *Acta Leiden*. 59:253-260.
- Erttmann K.D., Unnasch T.R., Greene B.M., Albiez E.I., Boateng J., Denk A.M., Ferraroni J.J, Karam M., Schulz-Key H. and Williams P.N. 1987. A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. *Nature*. 327: 415-417.
- Fernández-Salas I, Roberts DR, Rodriguez MH, Marina-Fernandez CE, 1994. Bionomics of larval populations of *Anopheles pseudopunctipennis* in the Tapachula foothills area, southern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10:477-486.
- Figueroa H. 1977. Enfermedad Robles una lesión cutánea poco frecuente. *Revista del Colegio Médico, Guatemala*. 28:81-84.
- Fuglsang H. & J. Anderson. 1977. The concentration of microfilariae 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.* 1977:28:63-67.
- Goa K. 1991. Ivermectin: a review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy on onchocerciasis. *Drugs*. 42: 640–658.
- Guevara A.G., Viera J.C., Lilley B.G., López A., Vieira N., Rumbia J., Collins R. Katholi C.R. and Unnasch T.R. 2003. Entomological evaluation by pool screen polymerase Chain reaction of *Onchocerca volvulus*

- transmission in Ecuador following mass MectizanTM distribution. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* 68:222-227.
- Greene B.M. 1984. Onchocerciasis. In: Warren, K.S. y Mahmoud A.A.F., ed. *Tropical and Geographical Medicine*. Mc Graw Hill-Inc., New York, USA. 1175. pp.
- Grillet, M.E., Basáñez, M.G., Vivas-Martínez, S., Villamizar, N., Frontado, H., Córtez, J., Coronel, P. y Botto, C. 2001. Human onchocerciasis in the amazonian area of southern Venezuela: spatial and temporal variation in biting and parity rates of black flies (Diptera:Simuliidae) vectors. *Journal of Medical Entomology*. 38: 520-30.
- Hernández Arreola, H. 1979. Epidemiología general y control de la oncocercosis. Gómez Priego M. (editor) en; *La oncocercosis en México memorias*. CIES. 23p. Hoerauf A, D W.Büttner, O Adjei, E Pearlman. 2003. Onchocerciasis. *BMJ*. 326: 207-210.
- Hoerauf A., Mand S., Volkmann L., Büttner M., Marfo- Debrekyei Y. and Taylor 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.
- IACO. 2001. Relatoría de la XI Conferencia Internacional sobre Oncocercosis (IACO), México, D.F. 27-29 noviembre 2001. 96. pp.
- Katholi C.R., Toé L., Merriweather A. and Unnasch T.R. 1995. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. *The Journal of Infectious Diseases*. 172:1414-17.
- Korin B.P. 1977. *Introduction to Statistical Methods*. Winthrop Publishers, Inc., Cambridge, Massachusetts.
- Kotz S., Johnson N.L., Read C.B. 1988. Method of statistical differentials, *Encyclopedia of Statistical Sciences* vol 8, Wiley, New York, pp. 646--6.
- Kouemeni L.E., Haque A. & Capron A. 1982. Detection of IgE antibodies in onchocerciasis. Possibility of using allergens of *Dipetalonema viteae*

- extracts that cross-react with allergenic determinants in crude extracts of *Onchocerca volvulus*. Clin. Exp. Immunology. 50:541.
- Klenk A., Geyer E., Zahner H. & Trojan H. 1983. Isolation of antigen from *Litomosoides carinii macrofilariae* detecting serum antibodies to *Onchocerca volvulus*. Z. Parasitenkd. 69:377.
- Nelson G.S. 1970. Onchocerciasis. In: Dawes B. ed. Advances in Parasitology. Academic Press, London. 8:1117 pp.
- Nutman T.B., Zimmerman P.A., Kubofcik J. and Kostyu D.D. 1994. A universally applicable diagnostic approach to filarial and other infections. Parasitology Today. 10:239-243.
- Martinez B.M. 1962. Historia de la enfermedad de Robles. Salud Pública México. 4:915-918.
- Magdi M.A. 2006. Inmunology Aspects of the pathogenesis of Human Onchocerciasis. Tesis de doctorado. Stockholm University. 14-17.
- Mazzotti L. 1984. The feasibility of using allergic reactions which follow the administration of hetrazan as an auxiliary means of diagnosis in onchocerciasis. Rev. Inst. Salud. Enfermed. Trop. Méx. 9:235-37.
- Meredith S.E., Lando G., Gbakima A.A., Zimmerman P.A. and Unnasch T.R. 1991. *Onchocerca volvulus*: application of the polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. Experimental Parasitology 73, 335-44.
- Meredith S.E., Unnasch T.R., Karam M., Piessens W.F and Wirth D.F. 1989. Cloning and characterization of an *Onchocerca volvulus*-specific DNA sequence. Mol Biochem Parasitol. 36:1-10.
- Murdoch M.E., Hay R.J., Mackenzie C.D., Williams J.F., Ghalib H.W., Cousens S., Jones B.R. and Abiose A. 1993. A clinical classification and grading system of the cutaneous changes in onchocerciasis. Br. J. Dermatol. 129:260-269.
- OEPA: Onchocerciasis Elimination Program of the Américas. 2008. [en línea] <<http://www.oepa.net>>.

- OEPA: Onchocerciasis Elimination Program of the América. 2005. XIV Conferencia Interamericana sobre Oncocercosis IACO 2004 [en línea] <<http://www.oepa.net>>.
- Organización Mundial de la Salud. 1989. Clinical and field trials of ivermectin for lymphatic filariasis. Report of an informal consultation. Ginebra: UNDP/World Bank/WHO-TDR.
- Organización Mundial de la Salud. 1987. Comité de Expertos de la OMS en Oncocercosis, Tercer Informe. OMS; Ginebra. 752 pp.
- Ottense E.A. 1984. Filariasis. In: Warren, K.S. y Mahmoud A.A.F., (eds). Tropical and Geographical Medicine. Mc Graw Hill-Inc., New York, USA. 1175 pp.
- Porter C.H. y Collins R.C. 1988. Vector density, parasite prevalence, and transmission of *Onchocerca volvulus* in Guatemala. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 39(6):567-74.
- Ramírez-Pérez J. 1985. Vectores de la oncocercosis humana en la región neotropical. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. 98:117-35.
- Ramírez-Pérez J. 1977. Estudio sobre la morfología de *Simulium metallicum*, vector de la oncocercosis humana en Venezuela. Organización Panamericana de la Salud.
- Remme J.H.F. 2004. Research for control: the onchocerciasis experience. Trop Med Int Health. 9(2):243-254.
- Rivas A. R., G. A. Schlie. 1987. La oncocercosis como problema de salud en el sureste de México. Bol Chil Parasitol. 42:58-63.
- Rodríguez-Pérez M.A. y Reyes-Villanueva F. 1994. Efecto de la ivermectina sobre la transmisión de *Onchocerca volvulus* en el sur de México. Salud Pública México. 36:281-290.
- Rodríguez-Pérez M.A., C.A. Núñez-González, C. Lizarazo-Ortega, A. Sánchez-Varela, M. C. Wooten, T. R. Unnasch. 2006. Analysis of genetic variation in ribosomal DNA internal transcribed spacer and the NADH

- dehydrogenase subunit 4 mitochondrial genes of the onchocerciasis vector *Simulium ochraceum*. *J Med Entomol.* Jul; 43(4):701-6.
- 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., Lilley B.G., Domínguez-Vázquez A., Segura A., R. Lizarazo-Ortega C. Mendoza-Herrera A., Reyes-Villanueva F. and Unnasch T.R. 2004. Polymerase chain reaction monitoring of transmission of *Onchocerca volvulus* in two endemic states in México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 70:38-45.
- Rodríguez-Pérez, M.A., Danis Lozano, R., Rodríguez, M.H., Unnasch, T.R. y Bradley, J.E. 1999c. Detection of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium ochraceum* sensu lato: Comparison of a PCR assay and fly dissection in a Mexican hypoendemic community. *Parasitology.* 119: 613-619.
- Rodríguez-Pérez M.A., Danis-Lozano R., Rodríguez M.H. and Bradley J.E. 1999. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies to *Onchocerca volvulus* on filter-paper blood spots: effect of storage and temperature on antibody decay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 523-524.
- Rodríguez-Pérez M.A, Rodríguez M.H., Margeli-Pérez H.M. and Rivas-Alcalá A.R. 1995. Effect of semiannual treatments of ivermectin on the prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* skin infection, ocular lesions, and on the infectivity of *Simulium ochraceum* populations in southern México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (in press).
- Rodríguez-Pérez M.A. y Rodríguez-López M.H. 1994. Oncocercosis: Enfermedades tropicales de México. Diagnostico, tratamiento y distribución geográfica. INDRE. S.S.A. 381 pp.
- Rodríguez-Pérez M.A. y Rivas-Alcalá R. 1991. Algunos problemas en la investigación para el control de la transmisión de *Onchocerca volvulus* en México. *Salud Pública México.* 33:493-503.

- Rodríguez-Pérez MA., Lizarazo-Ortega C., Hassan K.H., Domínguez-Vázquez A., Méndez-Galván J., Lugo-Moreno P., Sauerbrey M., Richards F., Unnasch T. 2008. Evidencia that *Onchocerca volvulus* transmission has been suppressed in the Oaxaca focus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 78:147-152.
- Rodríguez-Pérez, M.A., Lilley, B.G., Domínguez-Vázquez, A. Segura-Arenas, R. Lizarazo-Ortega, C. Mendoza-Herrera, A., Reyes-Villanueva, F. y Unnasch, T.R. 2004a. Polymerase chain reaction monitoring of transmission of *Onchocerca volvulus* in two endemic states in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70:38-45.
- Robles R. 1919. Onchocercose humaine au Guatémala produisant la cécité et 'l' erysipéle du littoral' (erisipela de la costa). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 12:442-63.
- Schulz-Key H. & Karam M. 1986. Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Today*. 2:284-286
- Shah J.S., Karam M., W.F. y Wirth D.F. 1987. Characterization of an *Onchocerca* specific DNA clone from *Onchocerca volvulus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 37:376-384.
- Schlié-Guzmán, M.A, A.R. Rivas-Alcalá. 1989. Inmunodiagnóstico de la oncocercosis. *Boletín Chileno de Parasitología* 43:11-15.
- Shelley A.J. 1994. Factors affecting filarial transmission by simuliids. *Advances in Disease Vector Research*, 10: 183-214.
- Tang J., Pruess K., Cupp E.W. and Unnasch T.R. 1996. Molecular phylogeny and typing of blackflies (Diptera: Simuliidae) that serve as vectors of human or bovine onchocerciasis. *Med Vet. Entomol.* 10:228-234.
- Takaoka H., Ochoa J.O., Juárez E.L. and Hansen K.M. 1982. Efects of temperatura on development of *Onchocerca volvulus* in *Simulium ochraceum* and longevity of the simuliid vector. *J. Parasitol.* 68: 478-483.
- Toé L., Merriweather, A. y Unnasch T.R. 1994. DNA probe-based classification of *Simulium dammosum* s.l. borne and human-derived filarial parasites in

- the Onchocerciasis Control Program area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51:676-683.
- Toé L., Back C., Adjami A.G., Tang J.M. y Unnasch T.R. 1997a. *Onchocerca volvulus*: comparison of field collection methods for the preservation of parasite and vector samples for PCR analysis. *Bulletin of the World Health Organization*. 75: 443-447.
- Thylefors B. 2004. Eliminating onchocerciasis as a public health problem. *Trop Med Int Health*. 9(4): 1-3.
- Unnasch TR. 2004. The current status of onchocerciasis in the forest/savanna transition zone of Cote d'Ivoire. *Parasitology*. 128:407-414.
- Unnasch, T.R. y Meredith S.E.O. 1996. The use of degenerate primers in conjunction with strain and species oligonucleotides to classify *Onchocerca volvulus*. In *Methods in Molecular Biology*, V. 50: Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods (ed. J.P. Clapp). Humana Press, Inc., Totowa, N.J.
- Vázquez-Castellanos J.L. 1991. Cafecultura e historia social de la oncocercosis en el soconusco, estado de Chiapas, México. *Salud publica de México*. 33:124-135.
- Vande-Waa E.A. 1991. Chemotherapy of Filariasis. *Parasitology Today* 7(8): 194-198.
- Yameógo, L., Toé, L., Hougard, J.M., Boatin, B.A. y Unnasch, T.R. 1999. Pool screen polymerase chain reaction for estimating the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium damnosum* sensu lato: results of a field trial in an area subject to successful vector control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 60:124-128.
- World Health Organization. 1991. Tenth Programme Report Tropical Diseases Progress in Research (1989-1990). UNDP/World/Bank/WHO. Special Programme for research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva. 49-101 pp.
- World Health Organization. 1995. Onchocerciasis and its control. World Health Organization. Technical Report Series 852, Geneva.

- World Health Organization. 2006. *Reporte de la XV Conferencia Interamericana sobre Oncocercosis en Guatemala*. Weekly Epidemiological Record. Año 81, 30: 293–296
- World Health Organization. 2007. *Wkly Epidemiol Rec* 82:197--208.
- World Health Organization. 2004. (En red), disponible en <http://www.who.int/tdr/diseases/oncho/>. Acceso 22 de Octubre de 2007.
- World Health Organization. 2001. Certification of elimination of human onchocerciasis: criteria and procedures. Geneva, document WHO/CDS/CPE/CEE'2001. 18(b). 36 pp.
- Whitworth J. 1998. Onchocerciasis. In microbiology and microbial infections (ed. F. E. G. Cox, J. P. Kreier). Topley y Wilson's (Arnold), London, U. K.
- Yagamata Y. y Kanayama A. 1985. Micro-distribution of *Simulium ochraceum* (Walker) (Diptera: *Simuliidae*) larvae in relation to stream depth at current velocity. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 36:227-231.
- Zea-Flores R., Richards F.O., Gonzalez- Peralta C., Castro-Ramirez J., Zea-Flores G., Collins R. C. and Cupp E. 1992. Adverse reactions after community treatment of onchocerciasis with ivermectin in Guatemala. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 663–666.
- Zimmerman P. A., Toe L. & Unnasch T. R. 1993. Design of *Onchocerca* DNA probes based upon analysis of a repeated sequence family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 259-268.
- Zimmerman P.A., Dadzie K.Y., DeSole G., Remme J., Soumbeiy-Alley E. and Unnasch T.R. 1992. *Onchocerca volvulus* DNA probe classification correlates with epidemiological patterns of blindness. *J Infect Dis* 165:964-968.
- Zhang S., Li B.W. & Weil G.J. 2000. Paper chromatography hybridization: a rapid method for detection of *Onchocerca volvulus* DNA amplified by PCR. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63:85-89.