

## Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen 47  
Volume

Número 3-4  
Number

Julio-Diciembre 2005  
July-December

*Artículo:*

### Herramientas moleculares para el combate de la oncocercosis en México

Derechos reservados, Copyright © 2005:  
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



medigraphic.com

# Herramientas moleculares para el combate de la oncocercosis en México

Mario A. Rodríguez-Pérez\*

Vol. 47, No. 3-4  
July - September, 2005  
October - December, 2005  
pp. 112 - 129

**RESUMEN.** La oncocercosis es una de las principales causas de ceguera en el mundo con aproximadamente 17.7 millones de individuos infectados que residen, principalmente, en las áreas endémicas en el oeste de África. La oncocercosis también es un problema de salud pública en México y se han implementado programas de control desde 1923. El diagnóstico de la oncocercosis se realiza mediante la detección de microfilarias en biopsias de piel y la transmisión se determina mediante la detección de larvas de *Onchocerca volvulus* en las poblaciones del insecto transmisor. Las larvas en el insecto se localizan mediante la disección individual de *Simulium ochraceum* s.l., el principal vector de la oncocercosis en México. Sin embargo, debido a que ivermectina elimina las microfilarias de piel (pero no tiene efecto sobre los gusanos adultos) la técnica de la biopsia de piel ha sido cada vez menos útil en el monitoreo del programa ivermectina. Asimismo, debido a que ivermectina ha tenido un efecto significativo sobre los niveles de transmisión del parásito, cada vez se requiere de la disección de un mayor número de ejemplares de *S. ochraceum* s.l. El tema de este trabajo es presentar el desarrollo de técnicas moleculares e inmunológicas que han sustituido el uso de la biopsia de piel y disección y su utilidad en el monitoreo del impacto del programa ivermectina, bajo un esquema de tratamiento semestral, sobre la transmisión de *O. volvulus* en México.

**Palabras clave:** ADN, diagnóstico, monitoreo, parásito, gusano.

**ABSTRACT.** Onchocerciasis is one of the major causes of blindness in the World, with about 17.7 million infected, particularly in West Africa. In Mexico, onchocerciasis is also present and has been subjected to control since 1923. The standard diagnosis of onchocerciasis is by the detection of microfilariae by skin biopsy and transmission is evaluated by detection of *Onchocerca volvulus* larvae in the vector. Classically, this was carried out by manual dissection of *Simulium ochraceum* s.l. However, with the use of ivermectin, a drug that kills microfilariae but not the adult worms, the skin biopsy is becoming no longer useful for detecting microfilariae levels and due to the reduced transmission, fly dissection is no longer viable. The subject of this paper is to present the immunological and molecular techniques developed to supersede the skin biopsy and fly dissection, and their diagnostic ability to assess the impact of multiple bi-annual mass ivermectin treatments on *O. volvulus* transmission in Mexico.

**Key words:** DNA, diagnosis, monitoring, parasite, worm.

## INTRODUCCIÓN

### ASPECTOS GENERALES DE LA ONCOCERCOSIS

La infección con el nematodo filariforme: *Onchocerca volvulus*.

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

duras de los simúlidos y la carga de microfilarias de piel. En su fase crónica conlleva a la invalidez de los individuos que la padecen. Por lo tanto, la oncocercosis tiene serias consecuencias socio-económicas en las comunidades endémicas de las áreas rurales muy pobres. En las comunidades hiperendémicas<sup>§</sup> de África alrededor del 70% de la población está infectada con microfilarias en piel y la mitad de los individuos desarrollan síntomas. El 15% de la población puede presentar graves problemas de piel y enfermedad en ojos y, 5% de ciegos por oncocercosis.<sup>140</sup> Por lo tanto, la oncocercosis es una de las principales causas que producen ceguera en el mundo; para facilitar su control y eliminación se han invertido grandes esfuerzos humanos y recursos económicos y ha estado sujeta a mucha investigación.

\* Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

§ Hipoendémica, comunidad con escasa transmisión del parásito y tasa de biopsia positiva a microfilarias del 20% o menos en una muestra de 30 personas adultas que hayan vivido en la comunidad al menos cinco años; mesoendémica, comunidad con moderada transmisión y biopsias de más del 20% y menos del 60%; hiperendémica, comunidad con elevada transmisión y biopsia del 60% o más.<sup>142</sup>

La Organización Mundial de la Salud<sup>142</sup> reconoce a esta enfermedad como un grave problema de salud pública, debido a que existen 123 millones de personas en riesgo de contraer la infección con el parásito, de las cuales 17.7 millones están infectadas y 270,000 ciegas (>0.5 millón con daño ocular).

#### *Distribución de la oncocercosis*

La oncocercosis afecta a los individuos de comunidades muy alejadas y aisladas que se dedican a la agricultura y su economía está considerada entre la más pobre del mundo. La prevalencia más alta se registra en África; también ocurre en pequeños focos endémicos en seis países de América Latina y en la Península Arábiga. En América Latina, más de 140,000 individuos están infectados con el parásito y 4.7 millones más están en riesgo de contraer la enfermedad. En el sur de México, se registran 630,000 personas en riesgo y 25,645 están infectados con el parásito.<sup>78,142</sup> Aunque en 1998 se registraron en nuestro país 112 casos de ceguera a consecuencia de la oncocercosis, afortunadamente no se tienen registros de nuevos casos.<sup>78</sup> Las áreas endémicas de oncocercosis en México se localizan en los estados de Oaxaca y Chiapas (Fig. 1). El foco endémico más extenso está situado en el sur de Chiapas, contiguo al área de Huehuetenango de Guatemala. Los focos endémicos de México y de Guatemala conforman una región con oncocercosis en la cual ocurren más del 50% de los casos reportados en América Latina. En esta región endémica México-Guatemala, la oncocercosis está relacionada con plantaciones de café y el periodo de transmisión máxima coincide con la época de sequía temprana en asociación con la presencia de poblaciones viejas del vector principal, *Simulium ochraceum* s.l.<sup>19,103</sup>



**Figura 1.** Focos endémicos de oncocercosis en México: 1) norte de Oaxaca, 2) y, norte 3) y sur de Chiapas. (Fuente: Secretaría de Salud, México).<sup>122</sup>

Se ha sugerido que el foco sur de Chiapas se originó por la migración de trabajadores procedentes de Guatemala, siguiendo la expansión del cultivo de café, y que el foco norte de Chiapas (en Los Altos de Chiapas), se estableció debido al empleo temporal de jornaleros infectados procedentes de las plantaciones del sur del Estado.<sup>34,133</sup> La mayoría de estos trabajadores son peones, que tres meses seguidos durante la época de secas (época de mayor transmisión del parásito), generalmente emigran con sus familias hacia las fincas donde los contratan. Lo anterior determinó que en el foco sur de Chiapas exista una población flotante de regular magnitud ( $\approx 50,000$  habitantes), procedente de Guatemala o en otros tiempos de Los Altos de Chiapas. El foco norte de Chiapas se produjo, por lo tanto, por casos “importados” de oncocercosis. En los últimos años se observa que, en la región de Los Altos de Chiapas, no ha habido migración hacia el foco sur de Chiapas y no se han detectado nuevos casos utilizando los métodos tradicionales de diagnóstico. Como consecuencia, no se había investigado si existía transmisión autóctona del parásito en el foco norte de Chiapas. De acuerdo a recientes estudios serológicos y entomológicos, y empleando técnicas de biología molecular, llevados a cabo durante los años de 2001 y 2005, se pudo comprobar la existencia de transmisión nativa del parásito en Los Altos de Chiapas.<sup>109</sup>

El foco de Oaxaca parece no tener conexión epidemiológica con los focos en Chiapas y Guatemala; sin embargo, éste pudo haberse formado por individuos que migraron hacia el sur para realizar, entre otras actividades, peregrinaciones religiosas. Los hallazgos parasitológicos y serológicos indicaron que la transmisión del parásito en Oaxaca estaba, en apariencia, suprimida por el tratamiento con ivermectina.<sup>78</sup> Sin embargo, en el último estudio entomológico de la transmisión en el área<sup>109</sup> se encontró que la transmisión del parásito aún persiste. El Programa Nacional de Salud 2001-2006, cuyo objetivo es reducir los rezagos en salud que afectan a los pobres, indica textualmente lo siguiente: “El 90% de la población oncocerosa del sureste de México son campesinos dedicados al cultivo del café. En esta región del país, se reconoce un elevado grado de analfabetismo y serias insuficiencias de los servicios públicos, incluyendo los de salud. La población indígena involucrada en la transmisión de la oncocercosis, la dispersión de la población y el tamaño de sus localidades, así como la topografía del terreno que dificulta el acceso, ubican a la enfermedad como prioritaria para la alta marginalidad de los grupos afectados. Por lo tanto, la oncocercosis representa un problema de salud pública de grupos de población altamente marginados y con el componente indígena”.<sup>119</sup> Actualmente, los cafeticultores del foco endémico al sur de Chiapas (Soconusco)

contratan a trabajadores migrantes que provienen, por lo general, de los departamentos de San Marcos, Huehuetenango y Petén que se ubican dentro del foco endémico Huehuetenango en Guatemala. Como se mencionó, la contratación de trabajadores indígenas del foco endémico norte de Chiapas, por parte de los cafecultores del Soco-nusco, ha disminuido notablemente en los últimos años. Actualmente, la población migrante de trabajadores del café que se exponen a las mordeduras del *S. ochraceum* s.l. y que están en riesgo de contraer la infección con el parásito en el foco sur de Chiapas es en su mayoría de origen guatemalteco.

#### *El ciclo de vida del parásito Onchocerca volvulus*

En la naturaleza, el parásito infecta sólo al humano, aunque, bajo condición experimental, se puede lograr la reproducción del parásito en el chimpancé, careciéndose de registros de infección natural en esta especie.<sup>39</sup> Los adultos de *O. volvulus* se encuentran en nódulos subcutáneos, viven en promedio ocho años, pero pueden persistir hasta los 15 años,<sup>101</sup> los gusanos hembra adultos producen más de 10 millones de microfilarias durante su vida y un individuo muy infectado puede albergar de 50-200 millones de éstas en su piel.<sup>140</sup> Las microfilarias migran hacia la piel donde son ingeridas por el proceso de alimentación del simúlido en el cual se desarrollan. En el huésped humano las microfilarias de piel pueden vivir de uno a dos años.<sup>42</sup> El desarrollo del parásito en el simúlido conlleva tres mudas. La primera muda convierte la microfilaria de piel a un estadio larval primario. Éste muda a un segundo estadio larval, el cual se desarrolla en los músculos de las alas del simúlido. La última muda produce el estadio larval tercero (o L3), el cual madura en la cavidad bucal del insecto, esperando entrar al humano a través de la herida que produce la mordida durante la alimentación del simúlido. En el humano, el tercer estadio larval muda dos veces. El parásito pasa del tercero al cuarto estadio larval, el cual se mueve rápido y localiza sitios para la maduración mediante señales químicas producidas por gusanos adultos ya establecidos.<sup>38</sup> La segunda muda del parásito en el humano ocurre entre uno y dos meses posterior a la infección. Las larvas del quinto estadio son adultos inmaduros que aún no están listos para producir las microfilarias.<sup>117</sup> Los gusanos hembra adultos ya maduros se instalan en nódulos pre-existentes o forman sus propios nódulos.<sup>116</sup> Los gusanos adultos están embebidos en nódulos fibrosos bien vascularizados. En promedio, se encuentran de uno a dos machos y de dos a tres hembras en el 80% de los nódulos. El gusano macho es pequeño (5-6 cm por 130–210  $\mu\text{m}$ ) y se mueve de nódulo a nódulo para inseminar a las hembras. El gusano hembra es más grande (20-70 cm por 270 a 400  $\mu\text{m}$ ) y, en teoría, des-

pués de ser inseminada puede producir entre 500 y 3,800 microfilarias cada día.<sup>41,45,118</sup> En la actualidad, en México es difícil encontrar más de un nódulo por paciente, y todos contienen de uno a dos hembras y un macho. En México, los nódulos se ubican fundamentalmente en la cabeza y tronco, mientras que en África es más común su localización en la cintura pélvica.

El periodo desde que se produce la infección con las L3s y aparecen las microfilarias que sean detectables en piel, es de entre 12 y 15 meses (rango = 7-34 meses). Las microfilarias se liberan en ciclos periódicos. Cada gusano hembra tiene de tres a cuatro ciclos productivos por año. Sin embargo, la frecuencia de estos ciclos y la producción de microfilarias disminuye conforme avanza la edad del gusano. El gusano hembra requiere de ser re-inseminada por los gusanos machos que se desplazan entre nódulo y nódulo.<sup>116</sup>

#### *Biología y ciclo de vida del transmisor Simulium ochraceum s.l.*

Los simúlidos tienen distribución cosmopolita. Los principales simúlidos transmisores de *O. volvulus* son complejos de especies: *S. damnosum*, *S. guianense*, *S. oyapockense*, *S. ochraceum*, *S. metallicum* y *S. exiguum*.<sup>142</sup> El principal transmisor del parásito en América Latina es *S. ochraceum* s.l. y aunque ha sido bien estudiado, todavía existen aspectos que requieren de mayor investigación. Las hembras del simúlido necesitan de una alimentación con sangre humana para completar el desarrollo de sus huevos. Los simúlidos colocan, bajo control hormonal, grupos de huevos sobre la vegetación que emerge de ríos y arroyos de corrientes de agua rápida.<sup>79,80,115</sup> Los huevos eclosionan en larvas que permanecen adheridas a la vegetación donde se alimentan y se desarrollan hasta convertirse en simúlidos adultos que abandonan los criaderos. La actividad alimenticia de *S. ochraceum* s.l. es máxima después de la salida del sol, perdura, a menor intensidad, durante el día y tiene otro pico antes de la puesta del sol.<sup>103</sup> *S. ochraceum* s.l. es un insecto que prefiere buscar humanos que animales para su alimentación con sangre.<sup>32</sup> La proporción de hembras de *S. ochraceum* s.l. con comidas de origen humano varía entre 0.75 y 0.99. La proporción restante corresponde a comidas de origen animal y, fue estimada, de manera indirecta, por el número de *S. ochraceum* s.l. que se encontraron con larvas filariformes que no pertenecieron a la especie de *O. volvulus*.<sup>103</sup> El periodo que transcurre entre alimentación y puesta de huevos en *S. ochraceum* s.l. es de dos a cuatro días, pero el desarrollo del parásito es de más de ocho días.<sup>26,112</sup> Por lo tanto, las larvas L3s no pueden ser transmitidas por *S. ochraceum* s.l. hasta su segunda ingesta de sangre después de la primera infección. Estudios de marca-

je y recaptura indican que *S. ochraceum* s.l. puede vivir por más de 27 días<sup>26</sup> y, por lo tanto, en teoría, puede transmitir larvas L3s sólo después de cuatro alimentaciones de sangre. En la naturaleza, sólo un pequeño porcentaje de la población de *S. ochraceum* s.l. está infectado (menos del 1% de la población total).<sup>121</sup> Sin embargo, debido al programa de tratamiento con ivermectina en México, la infección natural ha descendido a menos del 0.1%.<sup>109</sup>

La actividad alimenticia de *S. ochraceum* s.l. es estacional. Por lo tanto, la transmisión del parásito también es estacional y el nivel máximo se alcanza cuando ocurre la mayor tasa de hembras paridas que portan infección en cuerpo y con larvas L3s en cabezas.<sup>103</sup> *S. ochraceum* s.l. presenta una armadura bucofaríngea con pequeños dientes que laceran las microfilarias cuando éstas pasan hacia el estómago o intestino medio con lo cual ya no son capaces de penetrar los tejidos del insecto y completar su desarrollo. Este hecho tiene repercusión en la dinámica de transmisión del parásito. La habilidad para mantener la transmisión de aquellos simúlidos con armadura bucofaríngea, como en el caso de *S. ochraceum* s.l., depende de altas tasas de mordedura sobre el humano y la disponibilidad de reservorios de microfilarias. *S. ochraceum* s.l. es capaz de mantener áreas mesoendémicas e hiperendémicas debido a su alta susceptibilidad con el parásito, la gran abundancia del transmisor en las áreas endémicas y su alta preferencia alimenticia sobre humanos.<sup>9</sup>

#### *La patología y manifestaciones clínicas producidas por la infección con Onchocerca volvulus*

##### Oncocercomas (nódulos)

Los gusanos adultos están encapsulados en nódulos que se localizan en las prominencias óseas sobre la cabeza, el cinturón escapular y pélvico, costillas, trocánteres, rodillas y tobillos. Los nódulos, por lo general, no producen dolor. Sin embargo, existe la creencia de que los nódulos en cabeza son factores de riesgo que pueden ocasionar daño ocular.<sup>50</sup> La variación en forma del nódulo refleja la edad del nódulo.<sup>40</sup> Los nódulos pueden ser eliminados mediante una sencilla intervención quirúrgica (nodulectomía). La nodulectomía ha sido una de las actividades que se llevan a cabo por los programas de control de la oncocercosis en México y Guatemala desde los 40.<sup>110,121</sup> Sin embargo, el impacto de la campaña de nodulectomía, a largo plazo, sobre la dinámica de población del parásito y morbilidad de oncocercosis, no ha sido evaluado.<sup>113</sup>

Schulz-Key<sup>118</sup> realizó un estudio para estimar el número de nódulos y carga de microfilarias de piel en humano. El

hallazgo fue que hay un número considerable de gusanos hembra adultos escondidos en nódulos profundos, no visibles. Estos nódulos profundos pueden ser suficientes para mantener una alta población de microfilarias en piel y ojos.<sup>40</sup> La eliminación de nódulos visibles parece ser insuficiente para reducir la carga de microfilarias y, por lo tanto, mejorar la condición del individuo afectado.

En los cordones laterales, hipodermis y tejidos reproductores del parásito, se encuentra un microorganismo endosimbionte llamado *Wolbachia*. Este microorganismo es susceptible a la acción de las tetraciclinas y su desaparición del cuerpo de *O. volvulus*, provoca la esterilización y muerte de la filaria. Además, parece ser que las endotoxinas de esta bacteria producen daño al ojo al ser las inductoras de su inflamación.<sup>127</sup>

##### *Alteraciones dermatológicas (patología dérmica)*

La patología de la dermis está asociada con la presencia de microfilarias. La gravedad de la patología depende de la respuesta inmune del huésped humano en contra de la infección; o quizás, de la frecuencia de exposición al simúlido por el individuo. La patología puede ser clasificada, de acuerdo a la evolución de la enfermedad, en lesiones agudas o crónicas.<sup>86</sup> El síntoma más frecuente es el prurito e irritación. Este síntoma se presenta con varios grados de severidad y, en ocasiones, incapacita al individuo. Es un síntoma generalizado y está asociado con exoriación de la piel que se infecta secundariamente. Los primeros cambios en piel incluyen erupciones papilares por los abscesos intraepiteliales. En los individuos afectados de México y Guatemala, se observa un ligero cambio en la pigmentación de la piel de la cara conocida como "erisipela de la costa".<sup>102</sup> La lesión crónica de la piel le confiere al individuo una apariencia de edad prematura la cual está asociada con las siguientes características: hiperqueratosis y arrugamiento exagerado de la piel, atrofia de la epidermis, piel en extremo delgada, colgante (la respuesta inflamatoria origina la pérdida de la elasticidad cutánea lo que explica el síndrome de fascies leonina) y brillante<sup>1</sup>, despigmentación (piel de leopardo) y liquenificación de la piel. Al engrosamiento de la piel más la pérdida de elasticidad, se debe a la paquidermitis. Debido a que en algunos casos la patología y lesión de la piel, no es producida por la infección con *O. volvulus*, ha sido muy variable la comparación de las lesiones entre las diferentes áreas geográficas, el estudio de la historia natural de lesión en piel, así como el impacto de los programas de control sobre lesión en piel. En África, un método de diagnóstico rápido para clasificar el grado de endemicidad de una comunidad, está basado en la cuantificación del número de individuos que residen en la comunidad y, que presentan despigmentación de la piel o piel de

leopardo.<sup>23,43</sup> No obstante, en América Latina este método de diagnóstico rápido no tiene gran valor debido a que la infección treponémica (causante del mal del pinto), produce un cambio de piel de leopardo similar al producido por oncocercosis en el África.<sup>56</sup>

#### *Alteraciones oculares (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. En el inicio de la infección, unas pocas microfilarias pueden invadir la córnea y causar un exudado inflamatorio agudo alrededor de la microfilaria moribunda o muerta, lo que produce opacidades parecidas a copos de nieve (queratitis punteada) que se resuelven sin dejar secuelas. En realidad, la principal causa de las lesiones es la inflamación exacerbada en respuesta a las endotoxinas liberadas por la *Wolbachia*, cuando las microfilarias son destruidas por los polimorfonucleares. Sin embargo, en muchos individuos las reacciones agudas, producidas por las microfilarias en la córnea, pueden producir una inflamación crónica con formación fibrovascular. Ésta se inicia en los márgenes laterales inferior o medial de la córnea y, lentamente, se torna confluyente (queratitis esclerosante). La queratitis esclerosante produce un daño visual irreversible y llega a la ceguera si ésta invade el eje visual.<sup>140</sup> En México y Guatemala, la deformidad pupilar puede ser producida por oncocercosis y por otras causas de daño visual.<sup>141</sup> La atrofia del nervio óptico puede limitar los campos visuales, producir visión de túnel o pérdida total de percepción de la luz.

#### *Otros cuadros clínicos*

Aunque raramente, se presentan alteraciones sistémicas (renales y neurológicas) de origen iatrogénico, se han descrito alteraciones linfáticas en la región crural (ingle colgante), originada por inflamación y obstrucción linfática regional. Los pacientes con oncocercosis manifiestan síntomas como debilidad muscular, dolor de espalda, pérdida de peso y retardo en el crecimiento. También hay trastornos psicológicos y disfunción familiar y comunitaria por marginación social.

#### *Cepas o variantes genéticas de Onchocerca volvulus y el vector Simulium spp.*

La distribución de *O. volvulus* es amplia, ocupa casi todo el cinturón tropical de África y América, reportándose dos razas o variantes genéticas diferentes del parásito. En el oeste de África se reportaron dos variantes del parásito:

la raza de la “sabana” y la raza de la “selva”. Bajo condiciones experimentales, la variante de la selva o no se desarrolla, o se desarrolla lentamente, en los insectos vectores de la sabana (*S. sirbanum* y *S. damnosum* s.s.).<sup>140</sup> De Leon y Duke<sup>35</sup> observaron que *S. ochraceum*, *S. metallicum* y *S. callidum* s.l. ingirieron de 10 a 20 veces más microfilarias de *O. volvulus* al ser alimentados sobre individuos infectados de Guatemala, en comparación con el número de microfilarias ingeridas, de cualquiera de las dos variantes, sobre individuos del África. Igualmente, se observó poco desarrollo del parásito en los simúlidos de Guatemala que fueron alimentados con individuos infectados del África. Toè y colaboradores<sup>130</sup> demostraron que no hay transmisión preferencial de las dos formas del parásito en el África por las diferentes especies del complejo de *S. damnosum* s.l., el vector africano. Las variantes del parásito difieren en su patrón de distribución en el cuerpo humano y causan distintas patologías.<sup>37</sup> Las variantes de la sabana del África están asociadas con lesión ocular grave en el segmento anterior del ojo.<sup>142</sup> Prost<sup>98</sup> encontró que las complicaciones graves, tales como manifestación clínica linfática, dérmica y ocular, son más comunes en los individuos de las comunidades de la sabana que en aquéllas de la selva. Anderson y colaboradores<sup>1</sup> mostraron que la concentración de microfilarias de piel fue un 50% más alto en individuos de la sabana que en aquéllos de la selva. En contraste, el número de nódulos palpables en individuos de la selva fue un 50% más alto que en aquéllos de la selva. Para propósitos de control, se han diseñado sondas de ADN que permiten diferenciar la variante genética del parásito de la sabana (asociada a ceguera) con aquélla de la selva (variante menos patogénica). Meredith y colaboradores y Zimmerman y colaboradores<sup>81,148,149</sup> estudiaron la secuencia de ADN de la familia del segmento repetido O-150 del genoma de *O. volvulus*. El resultado de estas investigaciones fue el diseño de las sondas de ADN que se utilizan para confirmar la especie y variante genética del parásito. Por otro lado, aunque existe la creencia de que el parásito fue traído del África a América durante el mercadeo de esclavos,<sup>85</sup> existe también evidencia de daño por oncocercosis en cráneos de individuos que vivieron durante la época pre-colombina.<sup>48</sup> La variación intra-específica del parásito en las diferentes áreas endémicas y geográficas, junto con los cambios evolutivos asociados con la adaptación del parásito a los diferentes insectos vectores y razas humanas, a partir de un origen histórico, ha conducido a la existencia de complejos de transmisión *Onchocerca-Simulium* en casi cada uno de los focos endémicos. En estudios recientes en México, se ha reportado que la variante genética del parásito prevaleciente es la forma de la selva (no patogénica). El estudio se realizó con sondas específicas de ADN en una población pequeña de individuos trabajadores del café al sur de México,<sup>107</sup> por lo

que es necesario extender los estudios de clasificación de variantes genéticas del parásito en México. Asimismo, se ha encontrado que existe variabilidad genética intra-específica en el vector, *S. ochraceum* s.l. con al menos cuatro formas alélicas del gen dehidrogenasa, sub-unidad 4 (ND4, por sus siglas en inglés) y del subdominio 1 del espaciador interno transcrito (ITS1, por sus siglas en inglés), las cuales ocurren, en frecuencia variable, en cada uno de los tres focos endémicos de México. El ensayo de ADN heterodúplex se utilizó para explorar la estructura del ND4 del genoma mitocondrial de *S. ochraceum* s.l. y el ensayo de clonación y secuenciación se utilizó para explorar la variación nucleotídica del ITS1 ribosomal del genoma nuclear.<sup>87</sup> Sin embargo, la asociación entre estas variantes genéticas de *S. ochraceum* s.l. y las dos formas del parásito en México, requiere de ser investigada.

#### *Control y eliminación de la oncocercosis en África y América Latina*

##### Programas de control y eliminación de la oncocercosis

Debido a que los criaderos del simúlido se encuentran en ríos y arroyos de corriente rápida, la transmisión del parásito ocurre, por lo general, cerca de los criaderos larvales del simúlido. Puesto que la oncocercosis produce ceguera y está asociada con ríos, se le conoce también como "ceguera de los ríos". En el África, el control de la enfermedad se llevó a cabo por el Programa para el Control para la Oncocercosis (OCP, por sus iniciales en inglés). La estrategia de control del OCP consistió en esparcir larvicidas vía aérea y con frecuencia semanal, sobre todos los criaderos en los ríos pre-seleccionados por el OCP. Sin embargo, el descubrimiento de ivermectina para el tratamiento de la oncocercosis, a principios de los 90, dio origen a dos nuevos programas: El Programa Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA, por sus iniciales en inglés) y el Programa Africano para el Control de la Oncocercosis (APOC, por sus iniciales en inglés).<sup>11,142</sup> El OCP cuya estrategia se basó únicamente en la eliminación del vector, prácticamente eliminó la transmisión del parásito en el 90% de las comunidades seleccionadas.<sup>4</sup> Por tal éxito, el OCP extendió sus actividades de control en el año 1986 y sus beneficios alcanzaron 11 países africanos.<sup>83,84</sup> Sin embargo, el costo del programa basado sólo en la aplicación de larvicidas fue muy alto. Actualmente, las actividades de control se realizan, prácticamente, con el uso único de la ivermectina en la mayoría de los países donde la enfermedad es endémica. Sin embargo, el principal problema de salud pública aún subyace en los países del África que no fueron protegidos por el OCP y el problema consiste en una población de más de 15 millones de individuos infectados. Este número re-

presenta más del 80% del número total de individuos infectados con el parásito en el continente africano.<sup>100</sup> A pesar del gran éxito del OCP, el número global estimado de individuos con oncocercosis permanece casi sin cambio debido a que, aunque no exista transmisión en el área, los individuos siguen albergando los gusanos adultos. Por lo tanto, el nuevo APOC buscará establecer un programa de distribución de ivermectina sustentable de largo plazo, tanto en los países que fueron protegidos por el OCP, así como en los demás países africanos que sufren de esta enfermedad. Sin embargo, el panorama en África no es prometedor: se prevé, en el mediano plazo, una resurgencia de la oncocercosis como grave problema de salud pública en las áreas donde ya había sido controlada.

En México, así como en los otros países afectados en América Latina, los objetivos de los programas de eliminación y de OEPA son: 1) el control de morbilidad de oncocercosis; 2) eventual supresión e interrupción de la transmisión del parásito; y 3) eliminación la infección y, por lo tanto, de la oncocercosis como un problema de salud pública. La estrategia actual 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. En Brasil y Venezuela, el tratamiento con ivermectina es bajo un esquema anual o semestral;<sup>142</sup> los focos y comunidades endémicas de estos países están muy alejados, dentro de la selva amazónica; transportar y ofrecer ivermectina a los individuos que viven en estas áreas endémicas, dos veces al año, es imposible en muchos de los casos. En México, con el apoyo de OEPA, se ha establecido el Programa Nacional para la Eliminación de la Oncocercosis (PNEO).<sup>78</sup>

Es necesario asistir y apoyar al PNEO, para que éste consiga la meta de eliminación de la infección que produce la oncocercosis en México. Para ello, fue necesario desarrollar métodos de diagnóstico moleculares que se utilizan para determinar los parámetros epidemiológicos, tales como la prevalencia e incidencia de exposición al parásito por la población humana,<sup>104,105,108</sup> así como de los parámetros entomológicos, tales como la tasa de infección en cuerpos y cabezas del insecto vector (*S. ochraceum* s.l.) y el potencial anual de transmisión.<sup>106,109</sup> Este último parámetro entomológico es una medida del número de larvas de tercer estadio (L3s) que una persona recibe en un año cuando se expone a las mordeduras de *S. ochraceum* s.l.<sup>135</sup> Los estudios epidemiológicos son muy importantes para el PNEO ya que permiten determinar el impacto y progreso del programa ivermectina. Asimismo, con el fin de dirigir los esfuerzos de control, se requiere de métodos moleculares, que permitan detectar la transmisión de las razas patogénicas del parásito en la población humana y que pueda ser transmitido por una variante genética competente del vector *S. ochraceum* s.l.<sup>87,107</sup>

Con el uso de la tecnología de ADN recombinante, el diseño de sondas de ADN específicas para *O. volvulus* y ensayos de PCR, se ha evaluado el impacto del programa de tratamiento con ivermectina en México, el cual inició en el año 1989. La última estimación del impacto del programa ivermectina sobre la transmisión del parásito se realizó en el año 2001; es decir, después de aplicar 17 rondas de tratamiento.<sup>109</sup> En el periodo de 2004-2005, se está realizando la evaluación del progreso del programa ivermectina, bajo dos estrategias de distribución: semestral y trimestral, sobre la supresión e interrupción de la transmisión del parásito, en los tres focos endémicos de México.

#### *Ventajas y desventajas del tratamiento con ivermectina*

La ivermectina es un producto semi-sintético compuesto por una mezcla 80:20 de avermectinas B1a y B1b, las cuales son lactonas macrocíclicas sintetizadas por el actinomiceto *Streptomyces avermectilis*. La ivermectina se formula en tabletas de 6 mg y se administra de manera oral. La dosis recomendada de ivermectina es de 150 µg/kg de peso. Se excluyen del tratamiento con ivermectina a los niños menores de cinco años de edad o debajo de los 15 kg de peso, a las mujeres embarazadas, a las mujeres en periodo de lactancia (dentro de las primeras semanas posteriores al parto), a los individuos con desórdenes neurológicos, y a los individuos con enfermedad grave intercurrente y/o alérgicos a la droga. La ivermectina es un medicamento que elimina las microfilarias (microfilaricida), es seguro y tolerable en los humanos, ya que provoca escasas reacciones colaterales que son fácilmente manejables. La ivermectina, no mata a los gusanos adultos (sin actividad macrofilaricida), pero detiene el desarrollo larvario de las microfilarias y explica su desaparición en la piel del humano. En sólo tres rondas repetidas con ivermectina se logró una reducción de la carga de microfilarias en ojos del 70%,<sup>112</sup> lo cual resultó benéfico para los individuos por la resolución de las lesiones oculares en el segmento anterior del ojo. El tratamiento con ivermectina también reduce las cargas de microfilarias de piel a nivel indetectable dentro de pocos días.<sup>40,55</sup> Desafortunadamente, los gusanos adultos, cuyo tiempo de vida fértil es de entre nueve y 11 años, no son eliminados por ivermectina. La incapacidad de ivermectina para matar a los gusanos adultos, junto con el hecho de que las infecciones en oncocercosis son múltiples y acumulables y, en algunos individuos, asintomáticas, son unos de los problemas asociados con el control y eliminación de la enfermedad.

El impacto de los programas de ivermectina ha variado de una región geográfica a otra. Estudios entomológicos y de infección experimental de *S. ochraceum* s.l. llevados a

cabo en Guatemala, indicaron que la ivermectina es capaz de suprimir la transmisión;<sup>28-31</sup> sin embargo, estos hallazgos no fueron confirmados con el monitoreo, a largo plazo, del programa ivermectina. Por lo tanto, en Guatemala no se logró documentar la interrupción de la transmisión del parásito. En un estudio de infección experimental de *S. ochraceum* s.l., llevado a cabo en México, se encontró que aquellos individuos infectados que no reciben tratamiento regular y repetitivo con ivermectina, producen simúlidos con larvas L3s.<sup>114</sup>

En Camerún, se observó un impacto de la ivermectina sobre la prevalencia e intensidad de infección con microfilarias de piel en niños que no habían recibido tratamiento, pero que vivieron en comunidades protegidas con ivermectina.<sup>13</sup> En Sierra Leona, el tratamiento con ivermectina también suprimió, de manera significativa, las cargas de microfilarias;<sup>139</sup> sin embargo, cuando se tuvo un bajo nivel de cobertura con ivermectina, se observó sólo una reducción del 20% en el número de simúlidos con infección, por lo que se logró interrumpir la transmisión en el área.<sup>25</sup> En Ecuador, estudios parasitológicos indicaron una aparente supresión de la transmisión en el foco del Río Santiago, mientras que estudios entomológicos demostraron una reducción sustancial en la transmisión del parásito por *S. quadrivittatum* en el foco del Río Cayapas.<sup>57</sup> En México, las primeras rondas de tratamiento semestral con ivermectina redujeron las manifestaciones clínicas de la oncocercosis, pero tuvieron poco efecto sobre la transmisión del parásito, a pesar de un alto porcentaje de cobertura en la población elegible.<sup>112</sup> Por lo tanto, se concluyó que, en México así como en otros países endémicos donde el vector es poco competente como transmisor pero es muy abundante, la supresión e interrupción de la transmisión del parásito sólo sería posible mediante el sostenimiento del programa con ivermectina a largo plazo (por varios años).

#### *Desarrollo de nuevos medicamentos para la oncocercosis*

Debido a que la ivermectina no mata a los gusanos adultos, puede ser que ésta no sea la solución final para la oncocercosis. Por lo tanto, el desarrollo de un medicamento que elimine a los gusanos adultos (macrofilaricida) o el de una vacuna tendría un impacto substancial en el control y eliminación de la enfermedad. Los únicos medicamentos macrofilaricidas disponibles son: 1) La suramina, la cual es un medicamento obsoleto, demasiado tóxico para uso general e incluso puede en ocasiones ser fatal;<sup>140</sup> y 2) la amocarzina (CGP 6140),<sup>97</sup> la cual mostró tener actividad micro- y macrofilaricida en algunos estudios en América Latina<sup>88,94-96</sup> y en África.<sup>2</sup> Sin embargo, la eficacia adulticida del medicamento no quedó bien establecida y se requiere de un



mayor número de ensayos clínicos. Se han realizado ensayos *in vitro* de otros compuestos químicos con actividad macrofilaricida;<sup>123</sup> sin embargo, éstos requieren de ensayos *in vivo*, para probar su eficacia y utilidad observada en el sistema *in vitro*.

Con el objetivo de encontrar nuevas drogas macrofilaricidas, Langworthy y colaboradores<sup>65</sup> administraron durante seis meses el antibiótico oxitetraciclina a ganado vacuno infectado con el parásito *O. ochengi*. Todos los gusanos hembra adultos de *O. ochengi* quedaron estériles a consecuencia de la muerte de un gran número de microorganismos del género *Wolbachia*. Estos microorganismos se encuentran dentro de la célula (intra-celulares) del parásito hembra adulto de *O. volvulus* y son esenciales para el parásito. Cada especie de filaria *Onchocerca* alberga una especie de *Wolbachia* específica. Los gusanos hembra adultos no pueden transmitir estos microorganismos a su prole, es decir, la microfilaria. En ausencia de estos microorganismos simbiosis todos los gusanos hembra adultos quedan estériles; sin embargo no se conoce bien el mecanismo que permite la simbiosis entre el microorganismo y el parásito<sup>5,6,52</sup> y la aplicación de antibióticos en contra de *Wolbachia* con el objetivo de eliminar *O. volvulus*, presenta dificultades logísticas en las áreas endémicas. Por ejemplo, Hoerauf y colaboradores<sup>59,60</sup> mostraron que el tratamiento combinado con doxiciclina e ivermectina, dejó estériles a los gusanos hembra adultos de *O. volvulus* por al menos durante 18 meses; sin embargo, para lograr este efecto, deben de administrarse 100 mg del antibiótico, de manera oral, diariamente durante seis meses consecutivos. Este esquema de tratamiento no es práctico para uso masivo en las áreas endémicas y es sólo aconsejable para personas que dejan el área endémica y que desean quedar libres de infección de las microfilarias por un periodo largo de tiempo.

En resumen, todavía no existe un medicamento macrofilaricida o vacuna disponible para la oncocercosis. Por lo tanto, la ivermectina es el único medicamento eficaz, seguro y tolerable por los humanos que puede ser utilizado a nivel masivo, aplicado en dosis repetidas y bajo diferentes esquemas de tratamiento, en todas las áreas endémicas de oncocercosis en el mundo.

#### *Control y eliminación de la oncocercosis en México*

En México se iniciaron campañas de nodulectomía desde el año 1940 y tratamiento con ivermectina 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. Se ha documentado que en una comunidad endémica al sur de Chiapas, después de las primeras tres rondas con ivermectina y nodulecto-

mía, la carga de microfilarias de piel, el grado de lesión ocular y la tasa de infección en *S. ochraceum* s.l. se redujeron al 88%, 70% y 65% sobre su valor basal (antes de iniciar tratamiento con ivermectina y nodulectomía), respectivamente.<sup>112</sup> La incidencia de la enfermedad disminuyó notablemente por el tratamiento con ivermectina y nodulectomía en los años subsecuentes.<sup>78,105</sup> Para el año 2001, habiendo completado ya 17 rondas de ivermectina, el programa había tenido un impacto significativo sobre la supresión e interrupción de la transmisión del parásito en la mitad de las comunidades centinela de Oaxaca y Chiapas.<sup>109</sup> El objetivo siguiente será demostrar la supresión e interrupción de la transmisión del parásito en todas las comunidades de los tres focos endémicos de México. De manera que, eventualmente, se pueda documentar la eliminación de la infección que produce la oncocercosis en los dos estados de México. En teoría, la eliminación de la oncocercosis puede ser obtenida mediante la interrupción de la transmisión del parásito sobre un periodo de 16 años, que equivale a la vida del gusano hembra adulto. Sin embargo, por varias razones, para el año 2001 aún no había sido posible interrumpir la transmisión del parásito en todas las comunidades endémicas de Oaxaca y Chiapas. Los factores para explicar esto son múltiples y complejos, siendo uno de ellos el arribo de migrantes, trabajadores en las plantaciones del café, que reducen la cobertura con ivermectina ya que no habían recibido tratamiento. En un estudio realizado en el foco endémico al sur de Chiapas se encontró que cuando la población de trabajadores del café infectados con el parásito, se incorporaba a la población residente que quedaba sin tratamiento, por los criterios de exclusión antes señalados, se incrementaba el reservorio de microfilarias de piel disponibles para transmisión.<sup>111</sup> Por lo tanto, se concluyó que el programa ivermectina debería de incluir a estos individuos migrantes, que laboran de manera temporal en las plantaciones de café de Chiapas. Asimismo, se sugirió incorporar otras medidas para interrumpir la transmisión del parásito, en un tiempo mucho más corto que el requerido con el tratamiento único con ivermectina, tales como las actividades que reducen las poblaciones del insecto vector. En México, sin embargo, no ha sido posible implementar un programa dirigido a eliminar al insecto transmisor en cualquiera de los tres focos endémicos de oncocercosis; esto debido a graves problemas logísticos y económicos.

#### *Monitoreo y evaluación del control de la oncocercosis*

Las siguientes secciones describirán las estrategias y métodos que se utilizan en el monitoreo y evaluación del control de la oncocercosis. Actualmente, los métodos más adecuados para el monitoreo de los programas de control y

eliminación de la oncocercosis, han sido el ensayo de PCR acoplado a una ELISA o Southern blot para detectar ADN del parásito y una ELISA con antígenos recombinantes para la detección de anticuerpos anti-*O. volvulus* en población humana. El desarrollo de estos métodos de diagnóstico, así como de otros, han probado ser muy útiles para los programas de control y eliminación de la oncocercosis. Sin embargo, ha sido necesario calibrar y evaluar las pruebas moleculares e inmunológicas de acuerdo a la situación epidemiológica específica de cada región. Por ejemplo, los métodos de diagnóstico tradicional quedaron sin utilidad debido al progreso e impacto de la ivermectina sobre los diferentes indicadores parasitológicos y entomológicos. Asimismo, aun con los métodos moleculares de PCR e inmunoensayo ELISA, se han tenido que ir incorporando nuevas estrategias para lograr un monitoreo epidemiológico más efectivo y eficaz del programa ivermectina.

#### *Diagnóstico parasitológico de la infección con O. volvulus*

El método de diagnóstico estándar (prueba de oro) para la oncocercosis es la biopsia de piel.<sup>144</sup> El método consiste en obtener entre dos y seis biopsias de piel de las crestas ilíacas (pacientes africanos) y/de los hombros (pacientes americanos) con el uso de un esclerocorneótomo (un instrumento quirúrgico obsoleto en oftalmología). Este instrumento facilita la toma de las biopsias de piel, pero es un instrumento costoso, la cuchilla requiere de ser afilada, de manera regular y, debe de esterilizarse, en solución fría con glutaraldehído, cuando se aplica para cada uno de los pacientes. La biopsia de piel se pesa y se incuba toda la noche en 0.1 ml de medio de cultivo o solución salina en una placa de microtitulación. Aproximadamente, el 60% de las microfilarias en la biopsia de piel emergen pasados 30 minutos de incubación y el porcentaje de emergencia se incrementa hasta 75% pasadas las 24 horas. Las microfilarias son observadas a través de un microscopio de campo invertido y se registra su número. En comunidades con alta prevalencia e intensidad de infección, el método de la biopsia de piel es sensible y específico. Sin embargo, la sensibilidad del método depende de la intensidad de infección en la comunidad.<sup>125</sup> Dos biopsias de piel son suficientes cuando se presenta una alta intensidad de infección pero si se toman dos biopsias adicionales la precisión de la técnica mejora.<sup>125</sup> Sin embargo, en comunidades con baja intensidad de infección (carga de microfilarias menores a 3.5 microfilarias/biopsia de piel), aun tomando seis biopsias el resultado puede resultar en falso negativo.<sup>126</sup> Debido a que la ivermectina elimina el indicador de infección (la microfilaria) y debido a que la intensidad de infección con el parásito en México es baja, cada vez se utiliza menos el método de la biopsia de piel.

#### *Desarrollo de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la oncocercosis*

Los esfuerzos para mejorar el diagnóstico inmunológico de la oncocercosis han sido basados en la detección de anticuerpos anti-*O. volvulus*<sup>100</sup> y, en pocos estudios, en la detección de antígenos del parásito.<sup>3,134</sup> Este grupo de investigación<sup>3,134</sup> ha desarrollado pruebas ("oncho-dipstick" en inglés) basadas en la detección de antígenos específicos de *O. volvulus* presentes en orina y lágrimas. Sin embargo, las pruebas serodiagnósticas de oncocercosis, en las que se ha llevado a cabo un mayor número de investigaciones, son aquellas basadas en la detección específica de anticuerpos.

Los ensayos serológicos más prácticos, específicos y sensibles para la detección de anticuerpos del parásito, son el radioinmunoensayo (RIA por sus siglas en inglés) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA por sus siglas en inglés). Estos son ensayos simples indirectos, que detectan un anticuerpo unido a un extracto del parásito y se detecta con un segundo anticuerpo conjugado a un radioisótopo o a una enzima. Entre los 70 y 80, se investigó una variedad de extractos del parásito de *O. volvulus* para probar la especificidad de una ELISA en relación a otras especies de nematodos y, por lo tanto, obtener una prueba de detección de anticuerpos anti-*O. volvulus*. Sin embargo, aunque estos extractos o antígenos del parásito produjeron una ELISA de alta sensibilidad, muchas de las preparaciones dieron reacciones cruzadas con otras especies de nematodos, en particular, de filarias.<sup>8,20,27,61,62,64,72,73,76,77,91,124</sup>

Bartlett y colaboradores<sup>8</sup> utilizaron extractos crudos de parásitos de *O. volvulus*, pero la prueba produjo valores altos en los sueros usados como control negativo. Esto se atribuyó a contaminación con anticuerpos humanos que causó una reacción cruzada con el anticuerpo secundario. La especificidad de los antígenos en la prueba para detectar anticuerpos anti-*O. volvulus* fue mejorada mediante el fraccionamiento del extracto crudo del parásito para eliminar los contaminantes.<sup>76,77</sup> En áreas endémicas a oncocercosis, donde no coexisten otras especies de filarias, la especificidad de las pruebas no se vio afectada como se observó en sueros usados como control negativo que contenían anticuerpos humanos distintos a los de anti-*O. volvulus*.<sup>20,27,61,62,72,73,124</sup>

Varias pruebas fueron incapaces de reconocer, de manera específica, anticuerpos anti-*O. volvulus* al cruzar con anticuerpos producidos por la infección con otras especies de filarias. El grado de especificidad fue muy variable. Una prueba de ELISA aplicada en África no fue capaz de diferenciar entre *O. volvulus* y *Wuchereria bancrofti*.<sup>21</sup> Sin embargo, una prueba similar, aplicada en la misma región, fue capaz de distinguir entre oncocercosis, manzonelosis y loasis.<sup>124</sup> Debido a que los antígenos no

fueron específicos, se realizó un mayor número de investigaciones para definir los extractos del parásito que fueran específicos para *O. volvulus*.

A mediados de los 80 aparecieron los primeros reportes de la caracterización y purificación de antígenos, altamente específicos para *O. volvulus*.<sup>20-22,68,93,138</sup> El primer reporte del uso de un antígeno purificado para el serodiagnóstico de *O. volvulus* fue producido por Philipp y colaboradores.<sup>93</sup> Este antígeno tuvo un tamaño de 20 KDa y su localización sobre la superficie de la membrana del gusano adulto se determinó marcando el antígeno con el isótopo radiactivo I<sup>144</sup> y purificándolo por filtración en gel. El antígeno fue probado en un ensayo de radioinmunoprecipitación con sueros de individuos, portadores de anticuerpos de varias especies de filarias, colectados en diferentes áreas geográficas. La sensibilidad de la prueba en las áreas endémicas de oncocercosis donde no coexisten otras especies de filarias, tales como México, alcanzó hasta un 98%. La prueba no produjo reacción cruzada en sueros de individuos de Trinidad y Tobago infectados con *W. bancrofti* o *Manzonella ozardi* pero sí cruzó con sueros de individuos de la India infectados con *W. bancrofti*. Cabrera y Parkhouse<sup>21</sup> aislaron proteínas de la superficie de la membrana de *O. volvulus* y *O. gibsoni* en tampón de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Estos antígenos fueron evaluados en sueros de individuos con oncocercosis y otras infecciones mediante inmunoblot SDS-PAGE (por sus siglas en inglés). Los resultados demostraron que las proteínas de menor peso molecular fueron más específicas en la detección de anticuerpos anti-*O. volvulus* y estas proteínas sobre la superficie de la membrana contenían menos componentes que producían reacción cruzada inespecífica. De manera similar, Lobos y Weiss<sup>68</sup> demostraron que los antígenos que tienen un peso molecular en el rango de los 20 a 40 KDa fueron más específicos en la detección de anticuerpos anti-*O. volvulus*. Estos investigadores identificaron estos antígenos específicos mediante su marcaje con isótopo radiactivo, seguido de un ensayo de inmunoprecipitación con lotes de sueros de humanos con oncocercosis o filariasis linfáticas y los productos detectados por electroforesis de gel bidimensional. Cabrera y Parkhouse<sup>22</sup> desarrollaron una ELISA usando proteínas de la superficie de la membrana de *O. volvulus* y *O. gibsoni*. La ELISA fue probada con sueros de individuos colectados en diferentes áreas geográficas.<sup>20</sup> La ELISA fue 100% específica cuando se probó con sueros de individuos de las áreas endémicas de México. Estos individuos presentaron anticuerpos anti-*O. volvulus* y anticuerpos contra nematodos intestinales, pero no tuvieron anticuerpos contra otras especies de filarias. Sin embargo, cuando la ELISA se probó con sueros de individuos de las áreas endémicas de Venezuela y África, la sensibilidad y especificidad fue de 91%,

96% y de 93%, 93%, respectivamente usando como control negativo, sueros con anticuerpos contra *M. ozardi* y *W. bancrofti*. La ELISA con antígenos de bajo peso molecular fue capaz de detectar anticuerpos anti-*O. volvulus* en individuos de áreas endémicas, que resultaron negativos a microfilarias por biopsia de piel, indicando que la ELISA fue una técnica más sensible que la de la biopsia de piel.<sup>138</sup>

En los primeros años de los 90, se llevaron a cabo varias investigaciones con el uso de anticuerpos monoclonales para caracterizar antígenos específicos de *O. volvulus*.<sup>20,44,71,136</sup> Lucius y colaboradores<sup>71</sup> obtuvieron anticuerpos monoclonales dirigidos hacia antígenos de 33 y 20 KDa que fueron reconocidos por sueros de individuos con oncocercosis. Posteriormente, se determinó que el antígeno de 20 KDa era un subproducto de Ov33, el antígeno nativo, el cual se encontró en los órganos reproductores de los gusanos, en la cavidad pseudocelómica de los gusanos adultos y en las larvas L3s; la proteína también es liberada hacia la piel por las microfilarias.<sup>33</sup> Con el anticuerpo monoclonal se probaron, por inmunoblot, sueros de individuos con infecciones por filarias dando resultados prometedores. Sin embargo, cuando el anticuerpo monoclonal fue purificado por cromatografía de afinidad y utilizado en un ELISA, no fue capaz de discriminar entre sueros de pacientes con oncocercosis y filariasis linfáticas. Cabrera y colaboradores<sup>20</sup> desarrollaron una prueba de inhibición-ELISA con anticuerpos monoclonales que reconocieron antígenos de 15 y 25 KDa. Esta prueba presentó mejor sensibilidad y especificidad (98% y 94%, respectivamente) en comparación con el ELISA de tipo directo (94% y 96%, respectivamente) descrito anteriormente.

De igual manera, Engelbrecht y colaboradores<sup>44</sup> usaron una prueba de inhibición-ELISA con dos anticuerpos monoclonales. Una de las proteínas reconoció un antígeno de 30 KDa, es decir, el Ov33 descrito por Lucius y colaboradores.<sup>71</sup> La prueba detectó 80% de los individuos con oncocercosis. Wandji y colaboradores<sup>136</sup> produjeron tres anticuerpos monoclonales que fueron reconocidos por individuos infectados con *O. volvulus*; sin embargo, éstos no fueron especie-específicos.

Las investigaciones tuvieron como objetivo el desarrollar una prueba de diagnóstico específica para oncocercosis. Algunas de las pruebas que usaron antígenos purificados dieron resultados prometedores; sin embargo, no fueron 100% específicos. Si estas pruebas fueran a ser usadas por los programas de control y eliminación de la oncocercosis se requeriría de preparados del parásito de alta calidad. El uso de los anticuerpos monoclonales resolvió el problema de producción de proteínas de alta calidad; sin embargo, su uso en el diagnóstico aún depende de una prueba de inhibición-ELISA que requiere de preparados

del parásito. El problema asociado con la producción de antígenos específicos de alta calidad, en cantidades suficientes, fue resuelto con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante. El primer reporte de clonación de un antígeno inmunodominante (Ov33) de *O. volvulus* fue de Lucius y colaboradores.<sup>69</sup> Más tarde, se produjeron otros antígenos con valor inmunodiagnóstico: el Ov16<sup>66</sup> y la proteína completa de Ov33 en vectores de clonación pGEX2T y PCG808 en *Escherichia coli*.<sup>70</sup> Los antígenos resultantes estuvieron fusionados a la proteína glutatión S-transferasa (GST) y a maltosa (MBP por sus siglas en inglés), respectivamente<sup>66,70</sup> lo cual facilitó su purificación.

El método de Lucius y colaboradores<sup>69</sup> incluyó la construcción de una biblioteca  $\lambda$ gt11 de ADN complementario preparada a partir de la extracción de poli(A)<sup>+</sup> ARN de gusanos adultos de *O. volvulus*. Se realizó el tamizaje con sueros de individuos y se identificó la clona (colonia de bacterias) que resultó positiva a *O. volvulus*. El ADN de la clona positiva fue sub-clonado y el inserto secuenciado para inferir la estructura de aminoácidos del antígeno Ov33. Los investigadores observaron que la respuesta predominante a este antígeno en la ELISA fue cuando se utilizó la subclase IgG4. La prueba resultó con una sensibilidad y especificidad del 93% y 96%, respectivamente cuando se evaluó con un conjunto de sueros de individuos con oncocercosis y con infecciones de otras filarias. Lobos y colaboradores<sup>66</sup> identificaron la clona Ov16 cuyo ADN codifica para un antígeno inmunodominante de bajo peso molecular (22-30 KDa) reconocido por los anticuerpos anti-*O. volvulus* en sueros de individuos, pero no por los anticuerpos anti-*W. bancrofti*, *Brugia malayi*, *M. ozzardi*, *M. perstans* y *Loa loa*. El antígeno está presente en la hipodermis, la cutícula y el útero de los gusanos filáricos. La prueba con Ov16 fue capaz de detectar anticuerpos en sueros de chimpancé y humanos infectados con el parásito *O. volvulus* en estado de incubación o pre-detectable por lo que el antígeno Ov16 fue considerado ser un marcador de infección temprana.<sup>67</sup>

De manera similar, varios grupos de investigación siguieron los procedimientos de clonación de antígenos específicos mediante inmunotamizaje de bibliotecas de ADN complementario<sup>36</sup> y probados con sueros de individuos con oncocercosis y sueros de individuos con otras infecciones que pudieran resultar en una reacción cruzada inespecífica.<sup>16,24,51,75</sup> Bradley y colaboradores<sup>15</sup> realizaron los procedimientos de tamizaje de clonas en sueros con anticuerpos anti-*O. volvulus* y anti-*W. bancrofti*. Los últimos tomados de un área no endémica para oncocercosis. Como resultado se aislaron 31 clonas específicas, las cuales se tamizaron de nuevo con una técnica de microplaca de lisis usando sueros con anticuerpos anti-*O. volvulus* o con *W. bancrofti*. De este estudio, dos antígenos recombinantes (Ov 22/31M y Ov20/36M) fueron sub-clonados en el vector pHGS8, pro-

ducidos y purificados para su uso en ELISA. Estos antígenos fueron ensayados, de manera individual (Ov 22/31M o Ov20/36M) y de manera combinada (los dos antígenos) en contra de 31 sueros con anticuerpos anti-*O. volvulus* y 11 sueros con anticuerpos anti-*W. bancrofti*. Ambos antígenos retuvieron la especificidad de la ELISA del 100%; sin embargo, la sensibilidad disminuyó hasta un 74% y 45% para Ov22/31M y Ov20/36M, respectivamente. Los investigadores mencionaron que esto fue debido al hecho de que los sueros no habían sido pre-absorbidos para eliminar los anticuerpos anti-bacterianos, un paso que sería poco deseable o práctico de una prueba diseñada para operar bajo condiciones de campo en los países endémicos. Cuando ambos antígenos fueron usados en combinación, se obtuvo una sensibilidad de la prueba del 90%, indicando que la máxima sensibilidad debería ser obtenida si se realizara una fracción secundaria a partir del lisado de células de *E. coli*, durante el proceso de purificación de los antígenos y añadiendo otros antígenos recombinantes. Como consecuencia, se extendió el estudio de ensayo de un mayor número de antígenos recombinantes y de sueros de individuos.

El estudio se realizó con la colaboración de diversas instituciones<sup>99</sup> y el objetivo fue determinar la sensibilidad y especificidad de una ELISA con el uso de 34 antígenos recombinantes y sueros de individuos de diferentes áreas geográficas. Tres de estos antígenos (Ov29, Ov11 y Ov 7 {=Ov10}), usados en una ELISA, resultaron con suficiente porcentaje de sensibilidad sin la pérdida de especificidad y se produjeron como antígenos fusionados.<sup>16,131</sup> La ELISA con el uso de los tres antígenos combinados o cóctel de antígenos, fue capaz de detectar anticuerpos anti-*O. volvulus* en individuos residentes de casi todas las áreas endémicas y, también de las regiones de la sabana y de la selva africana donde existen otras especies de filarias. La prueba alcanzó una sensibilidad de entre 84% y 100%, siendo 100% específica.<sup>17</sup> El mismo cóctel en la ELISA fue utilizado para evaluar el éxito de un programa anti-vectorial y de tratamiento con ivermectina sobre la exposición al parásito medida por la aparición de anticuerpos anti-*O. volvulus* en los individuos.<sup>15,53</sup> También, la ELISA fue utilizada para determinar reaparición de anticuerpos anti-*O. volvulus* en áreas cuya transmisión del parásito ya había sido interrumpida<sup>143</sup> y para determinar nuevas áreas de transmisión del parásito.<sup>74</sup> Con el resultado de la ELISA se propuso un índice de exposición a la infección a nivel comunitario (índice serológico); el índice serológico se equiparó con la carga de microfilarias comunitaria estimada por la biopsia de piel.<sup>14</sup> En todos los estudios anteriores; sin embargo, en los sueros de los individuos se siguieron detectando anticuerpos anti-*O. volvulus*, incluso en aquellos individuos en donde ya no se detectaban microfilarias de piel, indicando que la ELISA no fue efecti-

va para distinguir entre una infección actual de una infección pasada. No se conoce con precisión cuánto tiempo perduran los anticuerpos anti-*O. volvulus*, que se producen por la infección con los diferentes estadios de vida del parásito. Sin embargo, el problema pudo ser superado con la aplicación de la ELISA a los niños nacidos después del inicio del programa antivectorial o de tratamiento con ivermectina, con lo cual se tuvo un grupo centinela indicador de exposición a la infección. Por ejemplo, Botto y colaboradores<sup>12</sup> sugirieron varios niveles de endemicidad de oncocercosis en las montañas Un-turán de Venezuela, de acuerdo al resultado de la ELISA con el cóctel de antígenos recombinantes. Los investigadores sugieren que un porcentaje alto de seroprevalencia en niños pudiera servir como un indicador de transmisión local intensa, lo que pudiera ayudar en la selección de comunidades para futuras evaluaciones epidemiológicas a profundidad.

Otros grupos de investigadores llevaron a cabo estudios de caracterización de proteínas recombinantes.<sup>24,89,90</sup> Estos grupos identificaron dos clonas: OC 3.6 y OC 9.3 con una técnica de placa dot-blot. La primera clona fue utilizada en un ensayo de inmunoblot para el diagnóstico de oncocercosis en niños del África. La prueba mostró ser útil para detectar anticuerpos antes de que la infección con el parásito fuera patente, ya que un grupo de 24 niños negativos a microfilarias de piel resultaron positivos a la prueba serológica. Ambos antígenos recombinantes (OC 3.6 y OC 9.3) fueron utilizados en una ELISA que detectó también anticuerpos de la subclase IgG4. La prueba presentó una sensibilidad del 95% y 81%, respectivamente y resultó negativa cuando se ensayó con sueros de individuos infectados con diferentes especies de filarias o con nematodos gastrointestinales. La iniciativa de la Organización Mundial de la Salud, fue recomendar una prueba con el antígeno óptimo para el monitoreo de los programas de control y eliminación de la oncocercosis. Como se indicó previamente, Ramachandran<sup>99</sup> reportó la evaluación de 34 antígenos recombinantes, los cuales fueron utilizados en un ELISA para determinar su reacción en sueros colectados en áreas con diferente estado epidemiológico. La especificidad y sensibilidad de esos antígenos varió de 75% a 100% y de entre 11% y 96%, respectivamente. Puesto que la especificidad de la prueba fue un requerimiento absoluto y debido a que la sensibilidad de la prueba puede ser aumentada con el uso de más de un antígeno, la resolución fue adoptar el uso del cóctel de antígenos recombinantes en ELISA.<sup>15-17</sup> Varios antígenos fueron seleccionados y probados para determinar su capacidad en la detección de la infección en estado inicial y pre-patente. De éstos, cuatro antígenos (Ov16, Ov7{=Ov10}, Ov11 y OC3.6) fueron fácilmente producidos usando el

protocolo de expresión y purificación de proteínas de New England Biolabs; de manera importante, fueron seleccionados por presentar la más alta especificidad. Posteriormente, se realizaron nuevos estudios serológicos usando la combinación de antígenos recombinantes propuesta por la OMS.<sup>10,74,104-105,108</sup>

Bloch y colaboradores<sup>10</sup> evaluaron tres antígenos recombinantes en una ELISA, de manera individual y combinada, usando sueros de pacientes infectados con *O. volvulus*, *W. bancrofti* y *Dracunculus medinensis*. Todos los sueros infectados con *O. volvulus* respondieron de manera positiva a cualquiera de los tres antígenos; sin embargo, se observó reacción cruzada en los sueros de los individuos con *D. medinensis*. Cuando los antígenos se probaron de manera individual, la especificidad más alta se obtuvo con Ov10 (60%) y la más baja con Ov16 (40%). Sin embargo, cuando se utilizaron los tres antígenos en combinación, la especificidad fue del 95%. Bloch y colaboradores<sup>10</sup> reconocieron que los antígenos individuales resultaron positivos a *D. medinensis* y *W. bancrofti* ya que los sueros fueron colectados en un área hiperendémica de *W. bancrofti*, mientras que Bradley y colaboradores<sup>17</sup> no obtuvieron este resultado debido a que los sueros fueron colectados en un área de baja transmisión de filarias linfáticas. Para mejorar la especificidad de cada uno de los antígenos, se propuso incrementar el valor del punto de corte (por lo general, la media + 3 DE de densidad óptica de un conjunto de individuos sin historia de infección) de la prueba serológica. Por lo tanto, cuando el punto de corte fue estimado como la media + 7 DE a partir de los resultados de sueros control, la especificidad para Ov10 y Ov16 fue de 100% y 95%, respectivamente.<sup>10</sup>

En cualquiera de los casos anteriormente descritos y que usaron combinaciones distintas de antígenos, el propósito fue aplicar la prueba para el monitoreo serológico de poblaciones de individuos y no para determinar el diagnóstico individual de cada una de las personas. Si este es el caso, entonces la prueba debe de ser extremadamente específica y, dentro de límites razonables, no necesariamente ser 100% sensible.<sup>18</sup> Con el resultado de un estudio en donde se utilizó ELISA con una combinación de tres antígenos recombinantes (Ov29, Ov11{=Ov20} y Ov10) se clasificaron las comunidades en varios niveles de endemicidad<sup>14</sup> y éste fue equiparable al resultado de clasificación de niveles de endemicidad por biopsia de piel. Por lo tanto, el monitoreo regular de un programa con el uso de esta prueba puede evaluar si el nivel de endemia está disminuyendo conforme progresa un programa de control o eliminación de la oncocercosis.

Una ELISA con tres antígenos recombinantes (Ov16, Ov7{=Ov10} y Ov11) fue evaluado para su uso con sangre capilar colectada en papel filtro, puesto que esta

prueba había sido empleada con suero obtenido de sangre venosa. Se requería, por lo tanto, una prueba que tuviera más aceptación en la población bajo estudio.<sup>104</sup> Esta ELISA fue probada para determinar el efecto de siete años de administración de ivermectina, bajo esquema semestral, sobre la incidencia de exposición a la infección y, de manera indirecta, sobre la transmisión del parásito.<sup>105</sup> En este estudio se confirmó que la ELISA, puede ser útil para estimar los niveles de endemia y que su aplicación en grupos centinela, previamente identificados como seronegativos, y por tanto no infectados, puede servir para investigar la presencia de transmisión del parásito en la comunidad. Estas observaciones también indicaron que la ELISA, puede reemplazar de manera efectiva a la biopsia de piel en las actividades de monitoreo de la campaña de eliminación de oncocercosis en México. La ELISA también fue comparada con una prueba serológica rápida diseñada para operar bajo condiciones de campo. Esta prueba es una tarjeta inmunocromatográfica que detecta anticuerpos de la subclase IgG4 de Ov16-GST anti-*O. volvulus*.<sup>137</sup> Ambas pruebas presentan 100% de especificidad en relación al hecho de que en las áreas endémicas de México no existe ninguna especie de filaria distinta a *O. volvulus*. La sensibilidad de la ELISA e ICT fue del 97% y 86%, respectivamente.<sup>103</sup> Actualmente, una ELISA que detecta anticuerpos de la subclase IgG4 de Ov16 de *O. volvulus* está siendo utilizada en los países endémicos de América Latina. Asimismo, se tiene la esperanza de que un grupo de investigadores en California desarrolle la anhelada prueba para la detección específica de antígenos del parásito. En un estudio serológico transversal en México,<sup>54</sup> se determinó la población de individuos con anticuerpos anti-*O. volvulus* que habían estado recibiendo tratamiento con ivermectina en dosis repetidas. La prueba de anticuerpos ELISA usó como antígeno un extracto crudo de *O. volvulus* y se detectó, asimismo, la respuesta IgG total y la subclase IgG4. Como se comentó anteriormente, la ELISA con antígenos crudos del parásito es una prueba inespecífica; sin embargo, en el estudio de Gómez-Priego y colaboradores,<sup>54</sup> se consideró el hecho de que en las áreas endémicas de México no coexisten filarias y *O. volvulus*.

#### *Desarrollo de sondas de ADN y ensayos de PCR para el diagnóstico de la oncocercosis*

El ensayo de PCR con sondas de ADN se ha vuelto un método muy útil en la detección de ADN del parásito. Debido a que este método puede detectar cualquier forma del parásito y de cualquier estadio de su ciclo de vida, su aplicación ha sido muy útil en el monitoreo de la infección, tanto en la población del humano como en la del insecto vector.

El desarrollo de tales sondas de ADN y ensayos de PCR se describe como sigue: En los 80, varias sondas de ADN de *Onchocerca* fueron aisladas mediante el tamizaje de bibliotecas genómicas construidas a partir de ADN genómico del parásito. Algunas de las sondas de ADN reconocieron todas las especies del género *Onchocerca*.<sup>92,120</sup> Sin embargo, dos sondas de ADN reconocieron, de manera específica, a *O. volvulus*.<sup>58,82</sup> Una fue específica para la variante del parásito de la selva, PFS-1<sup>47</sup> y otra para la variante de la sabana, pSS-1BT.<sup>46</sup> Estas sondas de ADN reconocen, de manera específica, a una familia de secuencias de ADN repetidas en tándem, con una unidad de repetición de longitud de 150 pares de bases (pb), presente en el genoma nuclear de *Onchocerca*.<sup>146</sup> Por ejemplo, la clona pOVS134 produjo 12 monómeros, ligados en tándem, de esta repetición de 150 pb.<sup>82</sup> 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* y la familia de secuencias repetidas parece estar arreglada en grandes hileras en el genoma nuclear.<sup>82</sup> En el transcurso de estas investigaciones, se desarrolló un ensayo de PCR que se utiliza para clasificar a los miembros del género *Onchocerca*.<sup>81,148</sup> 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 variante genética del parásito. La detección de productos de PCR con la sonda de ADN puede realizarse por Southern blot o ELISA.<sup>132</sup>

Existen varias aplicaciones prácticas derivadas del ensayo de la PCR con sondas de ADN de *O. volvulus* (de aquí en adelante se mencionará sólo como el PCR). El PCR fue usado para clasificar las extracciones de ADN del parásito a partir de larvas colectadas en disecciones de simúlidos hechas por los entomólogos dentro del área del OCP en el África.<sup>128-130</sup> 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.<sup>129</sup> Los resultados de estos estudios también sirvieron para re-estimar los potenciales anuales de transmisión en las áreas donde ocurren otras especies de filarias de animales. En estas áreas, el potencial de transmisión había sido sobrevalorado por el hallazgo de larvas L3s, que no eran de *O. volvulus*, en los simúlidos disecados por los entomólogos de campo. El resultado del estudio con el PCR permitió dirigir los esfuerzos de control hacia aquellas áreas donde los potenciales de transmisión de *O. volvulus* fueron altos.<sup>7</sup> Sin embargo, una desventaja del PCR fue que éste tuvo que aplicarse

de manera individual, para cada larva del parásito recolectada en *S. damnosum* s.l. 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, sin tener que realizar la laboriosa y tediosa disección de cada uno de los 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 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 cuerpos o en cabezas (y los límites de confianza estadísticos que rodean a la proporción) en la población total examinada por PCR.<sup>63</sup> Este procedimiento fue validado 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.<sup>106,145</sup> 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.<sup>57</sup> El segundo estudio entomológico con uso del PCR, a gran escala, se realizó en México.<sup>109</sup> En estos estudios, los productos de PCR fueron detectados por ELISA.<sup>132</sup> Actualmente, la PCR se está utilizando como método para estimar la transmisión del parásito en el África y en los seis países endémicos de América Latina.

Otra aplicación práctica del PCR fue su habilidad para detectar individuos con infección pre-patente mediante el análisis de biopsias de piel. El PCR presentó una mayor sensibilidad en comparación con la técnica de biopsia de piel.<sup>49,147,149</sup> Asimismo, el PCR fue utilizado para correlacionar patrones epidemiológicos de ceguera.<sup>129</sup> En este estudio se colectaron biopsias de piel de comunidades bien caracterizadas con base en estudios epidemiológicos y se les aplicó el PCR para determinar la variante del parásito prevaleciente. Se observó una alta asociación entre la variante del parásito encontrada y los casos de ceguera; por lo tanto, se concluyó que la PCR puede ser utilizado con un alto grado de sensibilidad y especificidad para predecir el potencial patogénico de poblaciones de parásitos.<sup>129</sup> Por último, en el sur de Chiapas, el PCR con sonda de ADN específica para clasificar la forma del parásito fue aplicado a un grupo de migrantes, trabajadores del café y se encontró que la forma prevaleciente del parásito corresponde a la forma selvática no patogénica.<sup>107</sup> Se requiere de extender este tipo de estudios en México y en los países de América Latina donde ocurre el parásito.

## AGRADECIMIENTOS

Este artículo de revisión forma parte de la tesis de doctorado de Mario A. Rodríguez-Pérez (Universidad de Salford, Inglaterra), la cual recibió una beca del CONACYT, México. Mario A. Rodríguez-Pérez es becario de la COFAA/IPN. Se agradecen los recursos económicos facilitados por el CONACYT (Proyectos con número de referencia: 43436, 34486-M, y 3320P-M) para llevar a cabo las investigaciones sobre oncocercosis que aquí se detallan. La Dra. Olga Real Najarro (Fundación Argos, Madrid, España) realizó una revisión exhaustiva del manuscrito final. Asimismo, se agradece el generoso apoyo de las siguientes instituciones: El Colegio de la Frontera Sur, El Instituto Nacional de Salud Pública y el Instituto Politécnico Nacional, en las cuales se han desarrollado investigaciones sobre oncocercosis, objeto de este trabajo.

## REFERENCIAS

1. Anderson, J., H. Fuglsang, P. J. S. Hamilton & T. F. d. C. Marshall. 1974. Studies on onchocerciasis in the United Cameroon Republic. I. Comparison of populations with and without *Onchocerca volvulus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 68:190-208.
2. Awadzi, K., N. O. Opoku, S. K. Attah, E. T. Addy, B. O. Duke, P. K. Nyame & N. A. Kshirgar. 1997. The safety and efficacy of amercazine in African onchocerciasis and the influence of ivermectin on the clinical and parasitological response to treatment. Ann. Trop. Med. Parasitol. 91:281-296.
3. Ayong, L. S., C. B. Tume, F. E. Wembe, G. Simo, T. Asonganyi, G. Lando & J. L. Ngu. 2005. Development and evaluation of an antigen detection dipstick assay for the diagnosis of human onchocerciasis. Trop. Med. Int. Health. 10:228-233.
4. Ba, O., M. Karam, J. Remme & G. Zerbo. 1987. Place des enfants dans l'évaluation du programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'ouest. Trop. Med. Parasitol. 38:137-142.
5. Bandi, C., T. J. Anderson, C. Genchi & M. L. Blaxter. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 265:2407-2413.
6. Bandi, C., J. W. McCall, C. Genchi, S. Corona, L. Venco & L. Sacchi. 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int. J. Parasitol. 29:357-364.
7. Barker, R. H. J. 1994. Use of PCR in the field. Parasitol. Today. 10:117-119.
8. Bartlett, A., D. E. Bidwell & A. Voller. 1975. Preliminary studies on the application of enzyme immunoassay in the detection of antibodies in onchocerciasis. Tropenmed. Parasitol. 26:370-374.
9. Basáñez, M. G. 1996. Density-dependent processes in the transmission of human onchocerciasis with particular reference to the *Onchocerca-Simulium* interaction. (Ph.D. thesis), University of London.
10. Bloch, P., P. E. Simonsen, N. Weiss & T. B. Nutman. 1998. The significance of guinea worm infection in the immunological diagnosis of onchocerciasis and bancroftian filariasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92:518-521.
11. Boatin, B., D. H. Molyneux, J. M. Hougard, O. W. Christensen, E. S. Alley, L. Yameogo, A. Seketeli & K. Y. Dadzie. 1997. Patterns of epidemiology and control of onchocerciasis in West Africa. J. Helminthol. 71:91-101.

12. Botto, C., A. J. Gillespie, S. Vivas-Martínez, N. Martínez, S. Planchart, M. G. Basáñez & J. E. Bradley. 1999. Onchocerciasis hyperendemic in the Unturán mountains: the value of recombinant antigens in describing a new transmission area in southern Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93:25-30.
13. Boussinesq, M., J. P. Chippaux, J. C. Ernould, D. Quillévéré & J. Prod'hon. 1995. Effect of repeated treatments with ivermectin on the incidence of onchocerciasis in northern Cameroon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:63-67.
14. Bradley, J. E., B. M. Atogho, L. Elson, G. R. Stewart & M. Boussinesq. 1998. A cocktail of recombinant *Onchocerca volvulus* antigens for serologic diagnosis with the potential to predict the endemicity of onchocerciasis infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:877-882.
15. Bradley, J. E., A. J. Gillespie, K. R. Trenholme & M. Karam. 1993. The effects of vector control on the antibody response to antigens of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology.* 106:363-370.
16. Bradley, J. E., R. Helm, M. Lahaise & R. M. Maizels. 1991. cDNA clones of *Onchocerca volvulus* low molecular weight antigens provide immunologically specific diagnostic probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46:219-227.
17. Bradley, J. E., K. R. Trenholme, A. J. Gillespie, R. Guderian, V. Titanji, Y. Hong & L. A. McReynolds. 1993. A sensitive serodiagnostic test for onchocerciasis using a cocktail of recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:198-204.
18. Bradley, J. E. & T. R. Unnasch. 1996. Molecular approaches to the diagnosis of onchocerciasis. *Adv. Parasitol.* 37:57-106.
19. Brandling-Bennett, A. D., J. Anderson, H. Fuglsang & R. C. Collins. 1981. Onchocerciasis in Guatemala. epidemiology in fincas with various intensities of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30:970-981.
20. Cabrera, Z., R. M. E. Parkhouse, K. Forsyth, A. Gómez-Priego, R. Pabon & L. Yarzabal. 1989. Specific detection of human antibodies to *Onchocerca volvulus*. *Trop. Med. Parasitol.* 40:454-459.
21. Cabrera, Z. & R. M. E. Parkhouse. 1986. Identification of antigens of *Onchocerca volvulus* and *Onchocerca gibsoni* for diagnostic use. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:225-231.
22. Cabrera, Z. & R. M. E. Parkhouse. 1987. Isolation of an antigenic fraction for diagnosis of onchocerciasis. *Parasite. Immunol.* 9:39-48.
23. Carne, B., M. V. Ntsoumou, Y. Samba & A. Yebakima. 1993. Prevalence of depigmentation of the shins: a simple and cheap way to screen for severe endemic onchocerciasis in Africa. *Bull. World Health Organ.* 71:755-758.
24. Chandrashekar, R., K. Masood, R. M. Alvarez, A. F. Ogunrinade, R. Lujan, F. O. Richards & G. Weil. 1991. Molecular cloning and characterization of recombinant parasite antigens for immunodiagnosis of onchocerciasis. *J. Clin. Invest.* 88:1460-1466.
25. Chavasse, D. C., J. A. Whitworth, P. A. Lemoh, S. Bennett & J. B. Davies. 1995. Low-level ivermectin coverage and the transmission of onchocerciasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89:534-537.
26. Collins, R. C., J. O. Ochoa, E. W. Cupp, C. González-Peralta & C. H. Porter. 1992. Microepidemiology of onchocerciasis in Guatemala: dispersal and survival of *Simulium ochraceum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:147-155.
27. Collins, W. E., C. C. Campbell, R. C. Collins & J. C. Skinner. 1980. Serologic studies on onchocerciasis in Guatemala using fixed-tissue sections of adult *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:1220-1222.
28. Cupp, E. W., M. J. Bernardo, A. E. Kiszewski, R. C. Collins & H. R. Taylor. 1986. The effects of ivermectin on transmission of *Onchocerca volvulus*. *Science.* 231:740-742.
29. Cupp, E. W., J. O. Ochoa, R. C. Collins, M. S. Cupp, C. González-Peralta, J. Castro & G. Zea-Flores. 1992. The effects of repetitive community-wide ivermectin treatment on transmission of *Onchocerca volvulus* in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:170-180.
30. Cupp, E. W., J. O. Ochoa, R. C. Collins, F. R. Ramberg & G. Zea-Flores. 1989. The effect of multiple ivermectin treatment on infection of *Simulium ochraceum* with *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:501-506.
31. Cupp, E. W. 1992. Treatment of onchocerciasis with ivermectin in Central America. *Parasitol. Today.* 8:212-214.
32. Dalmat, H. T. 1955. The Blackflies (Diptera:Simuliidae) of Guatemala and Their Role as Vectors of Onchocerciasis. Smithsonian Institution, Washington, D. C.
33. Darge, K., R. Lucius, M. H. Monson, J. Behrendsen & D. W. Buttner. 1991. Immunohistochemical and electron microscope studies of microfilarie in skin and lymph nodes from onchocerciasis patients after ivermectin treatment. *Trop. Med. Parasitol.* 42:367.
34. Davies J. B. 1968. A Review of Past and Present Aspects of Simulium Control in Mexico Together with Recommendations for the Future Conduct of Control Schemes and an Outline of an Erradication Scheme in the North Focus of Onchocerciasis in Chiapas State. Washington, DC: Pan American Health Organization.
35. De Leon, J. R. & B. O. L. Duke. 1966. Experimental studies on the transmission of Guatemala and West African strains of *Onchocerca volvulus* by *Simulium ochraceum*, *S. metallicum*, and *S. callidum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60:735-752.
36. Donelson, J. E., B. O. L. Duke, D. Moser, W. Zeng, N. E. Erondou, R. Lucius, A. Renz, M. Karam & G. Zea-Flores. 1988. Construction of *Onchocerca volvulus* cDNA libraries and partial characterization of the cDNA for a major antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31:241-250.
37. Duke, B. O. L., D. J. Lewis & P. J. Moore. 1966. *Onchocerca-Simulium* complexes I. transmission of forest and Sudan-savannah strains of *Onchocerca volvulus*, from Cameroon by *Simulium damnosum* from various West African bioclimatic zones. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60: 318-336.
38. Duke, B. O. L. 1991. Observations and reflections on the immature stages of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85:103-110.
39. Duke, B. O. L. 1962. Experimental transmission of *Onchocerca volvulus* from man to a chimpanzee. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 56:271.
40. Duke, B. O. L. 1990. Human Onchocerciasis-An overview of the disease. *Acta. Leiden.* 59:9-24.
41. Duke, B. O. L. 1993. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop. Med. Parasitol.* 44:61-68.
42. Eberhard, M. L. 1986. Longevity of microfilarie following removal of the adult worms. *Trop. Med. Parasitol.* 37:361- 363.
43. Edungbola, L. D., T. O. Alabi, G. A. Oni, S. O. Asaolu, B. O. Ogunbanjo & B. D. Parakoyi. 1987. 'Leopard skin' as a rapid diagnostic index for estimating the endemicity of African onchocerciasis. *Int. J. Epidemiol.* 16:590-594.
44. Engelbrecht, F., G. Eisenhardt, J. Turner, J. Sundaralingam, D. Owen, G. Braun, V. Connor & D. W. Taylor. 1992. Analysis of antibody responses directed against two *Onchocerca volvulus* antigens defined by monoclonal antibodies. *Trop. Med. Parasitol.* 43:47-53.
45. Engelbrecht, F. & H. Schulz-Key. 1984. Observations on adult *Onchocerca volvulus* maintained *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 8:212-215.
46. Erttmann, K. D., S. E. O. Meredith, B. M. Greene & T. R. Unnasch. 1990. Isolation and characterization of form specific DNA sequence of *O. volvulus*. *Acta. Leiden.* 59:253-260.
47. Erttmann, K.D., T. R. Unnasch, B.M. Greene, E. J. Albiez, J. Boateng, A. M. Denke, J. J. Ferraroni, M. Karam, H. Schulz-Key & P. N. Williams. 1987. A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. *Nature.* 327:415-417.
48. Figueroa, M. H. 1968. The origin of Robles' disease - imported or autochthonous? *Revista del Colegio Médico de Guatemala.* 19:305-309.



49. Freedman, D. O., T. R. Unnasch, A. Merriweather & K. Awadzi. 1994. Truly infection-free persons are rare in areas hyperendemic for African onchocerciasis (letter). *J. Infect. Dis.* 170:1054-1055.
50. 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.
51. Garate, T., F. J. Conraths, W. Harnett, D. W. Büttner & R. M. Parkhouse. 1990. Cloning of specific diagnostic antigens of *Onchocerca volvulus*. *Trop. Med. Parasitol.* 41:245-250.
52. Genchi, C., L. Sacchi, C. Bandi & L. Venco. 1998. Preliminary results on the effect of tetracycline on the embryogenesis and symbiotic bacteria (*Wolbachia*) of *Dirofilaria immitis*. An update and discussion. *Parassitologia.* 40:247-249.
53. Gillespie, A. J. 1994. Antibody responses to recombinant peptides of *Onchocerca volvulus*. (PhD. Thesis). University of London.
54. Gómez-Priego, A., R. Mendoza & J. L. De la Rosa. 2005. Prevalence of antibodies to *Onchocerca volvulus* in residents of Oaxaca, Mexico, Treated for 10 years with ivermectin. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 12:40-43.
55. Greene, B. M., R. B. Kenneth & H. R. Taylor. 1989. Use of ivermectin in humans, pp.311-323. In *Ivermectin and Abamectin*. Springer-Verlag Inc., ed. W.C. Campbell. New York, USA.
56. Guderian, R. H., M. Anselmi, M. Chico & P. J. Cooper. 1991. Onchocerciasis in Ecuador: dermal depigmentation, leopard skin and comparison with treponemal infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:639.
57. Guevara, A. G., J. C. Viera, B. G. Lilley, A. López, N. Vieira, J. Rumbua, R. Collins, C. R. Katholi & T. R. Unnasch. 2003. Entomological evaluation by pool screen polymerase chain reaction of *Onchocerca volvulus* transmission in Ecuador following mass Mectizan™ distribution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:222-227.
58. Harnett, W., A. E. Chambers, A. Renz & R. M. E. Parkhouse. 1989. An oligonucleotide probe specific for *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35:119-125.
59. Hoerauf, A., S. Mand, O. Adjei, B. Fleischer & D. W. Büttner. 2001. Depletion of wolbachia endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *Lancet.* 357:1415-1416.
60. Hoerauf, A., L. Volkmann, C. Hamelmann, O. Adjei, I. B. Autenrieth, B. Fleischer & D. W. Büttner. 2000. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet.* 355:1242-1243.
61. Ito, M., M. Kamiya & A. Lujan. 1984. Fluctuation of ELISA and skin biopsy results in individual inhabitants re-examined after several months in the endemic area of Guatemala onchocerciasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78:553-555.
62. Karam, M. & N. Weiss. 1985. Seroepidemiological investigations of onchocerciasis in a hyperendemic area of West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34:907-917.
63. Katholi, C. R., L. Toè, A. Merriweather & T. R. Unnasch. 1995. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. *J. Infect. Dis.* 172:1414-1417.
64. Klenk, A., E. Geyer & H. Zahner. 1984. Serodiagnosis of human onchocerciasis: evaluation of sensitivity and specificity of a purified *Litomosoides carinii* adult worm extract. *Tropenmed. Parasitol.* 35:81-84.
65. Langworthy, N., A. Renz, U. Meckenstedt, K. Henkle-Duhrsen, M. Bronsvort, V. Tanya & A. J. Tress. 1996. Onchocerciasis chemotherapy: macrofilaricidal activity of oxytetracycline against *Onchocerca ochengi* in cattle, and *Wolbachia*-like endosymbionts. In *Spring Meeting of the British Society for Parasitology*. The British Society for Parasitology, University of Warwick. 43-44.
66. Lobos, E., M. Altmann, G. Mengod, N. Weiss, W. Rudin & M. Karam. 1990. Identification of an *Onchocerca volvulus* cDNA encoding a low-molecular-weight antigen uniquely recognized by onchocerciasis patient sera. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39:135-46.
67. Lobos, E., N. Weiss, M. Karma, H. R. Taylor, E. A. Ottesen & T. B. Nutman. 1991. An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen: a specific and early marker of infection. *Science.* 251:1603-05.
68. Lobos, E. & N. Weiss. 1986. Identification of non-cross-reacting antigens of *Onchocerca volvulus* with lymphatic filariasis pools. *Parasitology.* 93:389-399.
69. Lucius, R., N. Erondy, A. Kern & J. E. Donelson. 1988. Molecular cloning of an immunodominant antigen of *Onchocerca volvulus*. *J. Exp. Med.* 168:1199-1204.
70. Lucius, R., A. Kern, T. Seeber, T. Pogonka, J. Willenbacher, H. Taylor, M. Pinder, H. W. Ghalib, H. Schulz-Key & P. Soboslay. 1992. Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33kD *Onchocerca volvulus* protein (Ov33). *Trop. Med. Parasitol.* 43:139-145.
71. Lucius, R., H. Schulz-Key, D. W. Büttner, A. Kern, B. Kaltmann, J. Prod'hon, F. Seeber, R. D. Walter, K. C. Saxena & H. J. Diesfeld. 1988. Characterization of an immunodominant *Onchocerca volvulus* antigen with patient sera and a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 167:1505-1510.
72. Lujan, R., W. E. Collins, P. S. Stanfill, C. C. Campbell, R. C. Collins, W. Brogdon & A. Y. Huong. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of Guatemalan onchocerciasis: comparison with the indirect fluorescent antibody (IFA) test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:747-52.
73. Lujan, R., W. E. Collins, P. S. Stanfill, C. C. Campbell, R. C. Collins & A. Y. Huong. 1984. Comparison of heterologous adult *Brugia malayi* and homologous *Onchocerca volvulus* antigen in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Guatemalan onchocerciasis. *J. Parasitol.* 70:385-90.
74. Maia-Herzog, M., A. J. Shelley, J. E. Bradley, A. P. A. Luna Dias, R. H. S. Calvão, C. Lowry, M. Camargo, J. M. Rubio, R. J. Post & G. E. Coelho. 1999. Discovery of a new focus of human onchocerciasis in central Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 235-239.
75. Maizels, R. M., J. E. Bradley, R. Helm & M. Karam. 1990. Immunodiagnosis of onchocerciasis: circulating antigens and antibodies to recombinant peptides. *Acta. Leiden.* 59:261-270.
76. Marcoullis, G. & R. Grasbeck. 1976. Preliminary identification and characterization of antigen extracts from *Onchocerca volvulus*. *Tropenmed. Parasitol.* 27:314-322.
77. Marcoullis, G., E. M. Salonen & R. Grasbeck. 1978. Sequential affinity chromatography for the purification of antigens extracted from *Onchocerca volvulus* adult worms. *Tropenmed. Parasitol.* 29:39-48.
78. Martín-Tellaache, A., J. Ramírez-Hernández, J. I. Santos-Preciado & J. Méndez-Galván. 1998. Onchocerciasis: changes in transmission in Mexico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1:S117-9.
79. McCall, P. J., M. D. Wilson, B. D. Dueben, B. M. de Clare Bronsvort & R. R. Heath. 1997. Similarity in oviposition aggregation pheromone composition within the *Simulium damnosum* (Diptera:Simuliidae) species complex. *Bull. Entomol. Res.* 87:609-616.
80. McCall, P. J., R. R. Heath, D. Dueben & M. D. Wilson. 1997. Oviposition pheromone in the *Simulium damnosum* complex: biological activity of chemical fractions from gravid ovaries. *Physiol. Entomol.* 22:224-230.
81. Meredith, S. O., G. Lando, A. A. Gbakima, P. A. Zimmerman & T. R. Unnasch. 1991. *Onchocerca volvulus*: application of the polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Exp. Parasitol.* 73:335-344.
82. Meredith, S. E. O., T. R. Unnasch, M. Karam, W. F. Piessens & D. F. Wirth. 1989. Cloning and characterization of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989:36:1-10.

83. Molyneux, D. H. & J. B. Davies. 1997. Onchocerciasis control: moving towards the millennium. *Parasitol. Today*. 13:418-425.
84. Molyneux, D. H. 1995. Onchocerciasis control in West Africa: current status and future of the onchocerciasis control programme. *Parasitol. Today*. 11:399-402.
85. Mouchet, J. & M. Teppaz. 1993. L'introduction de l'onchocercose en Amerique Centrale: le rôle du corps expeditionnaire français au Mexique (1861-1867). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 86:125-128.
86. Murdoch, M. E., R. J. Hay, C. D. Mackenzie, J. F. Williams, H. W. Ghalib, S. Cousens, B. R. Jones & A. Abiose. 1993. A clinical classification and grading system of the cutaneous changes in onchocerciasis. *Br. J. Dermatol.* 129:260-269.
87. Núñez-González, C.A. 2004. Análisis molecular de *Simulium ochraceum* sensu lato (Diptera:Simuliidae) de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal y del gen ND4 mitocondrial. (Tesis Maestría en Ciencias). Instituto Politécnico Nacional, México.
88. Nutman, T. B., W. Parredes, J. Kubofcik & R. H. Guderian. 1996. Polymerase chain reaction-based assessment after macrofilaricidal therapy in *Onchocerca volvulus* infection. *J. Infect. Dis.* 173:773-776.
89. Ogunrinade, A. F., R. Chandrashekar, M. L. Eberhard & G. J. Weil. 1993. Preliminary evaluation of recombinant *Onchocerca volvulus* antigens for serodiagnosis of onchocerciasis. *J. Clin. Microbiol.* 31:1741-1745.
90. Ogunrinade, A. F., R. Chandrashekar, G. J. Weil & O. O. Kale. 1992. Use of a recombinant antigen (OC 3.6 cDNA) for the serological diagnosis of onchocerciasis in exposed Nigerian children. *J. Trop. Pediatr.* 38:103-105.
91. Ouaiissi, A., L. E. Kouemeni, J. Cornette, R. Pierce & A. Capron. 1983. Detection of IgE antibodies in onchocerciasis using a semi-purified fraction from *Dipetalonema viteae* total antigen. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 70:570-575.
92. Perler, F. B. & M. Karam. 1986. Cloning and characterization of two *Onchocerca volvulus* repeated DNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21:171-178.
93. Philipp, M., A. Gómez-Priego, R. M. E. Parkhouse, M. W. Davies, N. W. T. Clark, B. M. Ogilvie & F. Beltrán-Hernández. 1984. Identification of an antigen of *Onchocerca volvulus* of possible diagnostic use. *Parasitology.* 89:295-309.
94. Poltera, A. A., O. Reyna, G. Zea-Flores, F. Beltranena, A. Nowell de Arevalo & F. Zak. 1991. Use of an ophthalmologic ultrasound scanner in human onchocercal skin nodules for non-invasive sequential assessment during a macrofilaricidal trial with amorcezine in Guatemala. The first experiences. *Trop. Med. Parasitol.* 42:303-307.
95. Poltera, A. A., G. Zea-Flores, R. Guderian, F. Beltranena, R. Proana, M. Moran, F. Zak, & H. P. Striebel. 1991. Onchocercacidal effects of amorcezine (CGP6140) in Latin America. *Lancet.* 337:583-584.
96. Poltera, A. A., G. Zea-Flores, R. Guderian, H. P. Striebel & M. Moran. 1991. Longterm follow-up of onchocerciasis patients in Latin America after treatment with amorcezine. Preliminary results. *Trop. Med. Parasitol.* 42:308-313.
97. Poltera, A. A. 1988. Onchocerciasis: bi-annual mass therapy or once every two years? ivermectin versus possible amorcezine. In "Clone, Cure and Control", tropical Health for the 21st Century, pp. poster #47 p. 133.
98. Prost, A. 1980. Le polymorphisme des onchocercoses humaines ouest-africaines. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 55:239-245.
99. Ramachandran, C. P. 1993. Improved immunodiagnostic tests to monitor onchocerciasis control programmes- A multicenter effort. *Parasitol. Today.* 9:76-79.
100. Remme, J. H. F. 1995. The African Programme for Onchocerciasis control: preparing to launch. *Parasitol. Today.* 11:403-406.
101. Roberts, J. M. D., E. Neumann, C. W. Gockel & R. B. Highton. 1967. Onchocerciasis in Kenya 9, 11, and 18 years after elimination of the vector. *Bull. World Health Organ.* 37:195-212.
102. Robles, R. 1919. Onchocercose humaine au Guatémala produisant la cécité et 'l'erysipèle du littoral' (erisipela de la costa). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 12:442-463.
103. Rodríguez Pérez, M. A. & F. Reyes Villanueva. 1994. Efecto de la ivermectina sobre la transmisión de *Onchocerca volvulus* en México. *Salud Pública Mex.* 36:281-290.
104. Rodríguez-Pérez, M. A., R. Danis-Lozano, M. H. Rodríguez & J. E. Bradley. 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. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93:523-524.
105. Rodríguez-Pérez, M. A., R. Danis-Lozano, M. H. Rodríguez & J. E. Bradley. 1999. Comparison of serological and parasitological assessments of *Onchocerca volvulus* transmission after 7 years of mass ivermectin treatment in Mexico. *Trop. Med. Int. Health.* 4:98-104.
106. Rodríguez-Pérez, M. A., R. Danis-Lozano, M. H. Rodríguez, T. R. Unnasch & J. E. Bradley. 1999. 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.
107. Rodríguez-Pérez, M. A., M. De la Garza-Barbosa & C. Lizarazo-Ortega. 2004. Assessment of *Onchocerca volvulus* strains in Mexico. IX European Multicolloquium of Parasitology. Jul19-23; Valencia, Spain.
108. Rodríguez-Pérez, M. A., A. Domínguez-Vázquez, J. Méndez-Galván, A. M. Sifuentes-Rincón, P. Larralde-Corona, H. A. Barrera-Saldaña & J. E. Bradley. 2003. Antibody detection test for *Onchocerca volvulus*; comparison of the sensitivity of a cocktail of recombinant antigens used in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay with a rapid-format antibody card test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97:539-541.
109. Rodríguez-Pérez, M. A., B. G. Lilley, A. Domínguez-Vázquez, R. Segura-Arenas, C. Lizarazo-Ortega, A. Mendoza-Herrera, F. Reyes-Villanueva & T. R. Unnasch. 2004. Polymerase chain reaction monitoring of transmission of *Onchocerca volvulus* in two endemic states in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70:38-45.
110. Rodríguez-Pérez, M. A. & A. R. Rivas-Alcalá. 1991. Algunos problemas en la investigación para el control de la transmisión de *Onchocerca volvulus* en México. *Salud Pública Mex.* 33:493-503.
111. Rodríguez-Pérez, M. A., M. H. Rodríguez & R. Danis-Lozano. 2000. Epidemiología de la oncocercosis en México: participación de trabajadores migrantes infectados en el mantenimiento de la transmisión del parásito. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42:97-98.
112. Rodríguez-Pérez, M. A., M. H. Rodríguez, H. M. Margeli-López & A. R. Rivas-Alcalá. 1995. Effect of semiannual treatments of ivermectin on the prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* skin infection, ocular lesions, and infectivity of *Simulium ochraceum* populations in southern Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52:429-434.
113. Rodríguez-Pérez, M. A. & M. H. Rodríguez-López. 1994. Oncocercosis. En *Enfermedades Tropicales en México. Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica* (ed. J. L. Valdespino-Gómez, O.V. Castrejón, A. Escobar-Gutiérrez, A. del Río-Zolezzi, S. Ibáñez-Bernal & C. Magos-López). Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud de México. D.F.
114. Rodríguez-Pérez, M. A. & M. A. Sandoval-Bautista. Experimental infection of *Simulium ochraceum* s.l.(Diptera:Simuliidae) in an ivermectin controlled area of Mexico. Southwest. *Entomol.* En prensa.
115. Rodríguez-Pérez, M. A., N. L. Valdivieso-López & P. J. McCall. 2003. Aggregated oviposition in *Simulium ochraceum* s. l. (Diptera:Simuliidae), an important Neotropical vector of *Onchocerca volvulus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97:203-207.

116. Schulz-Key, H. & M. Karam. 1986. Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*. Parasitol. Today. 2:284-286.
117. Schulz-Key, H. 1988. The collagenase technique: How to isolate and examine adult *Onchocerca volvulus* for the evaluation of drug effects. Trop. Med. Parasitol. 39:423-440.
118. Schulz-Key, H. 1990. Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*. Acta Leiden. 59:27-44.
119. Secretaría de Salud. 2001. Programa de Acción: Enfermedades transmitidas por vector. Primera Edición. D.F. México.
120. Shah, J. S., M. Karam, W. F. Piessens & D. F. Wirth. 1987. Characterization of an *Onchocerca*-specific DNA clone from *Onchocerca volvulus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37:376-384.
121. Shelley, A. J. 1988. Vector Aspects of the Epidemiology of Onchocerciasis in Latin-America. Annu. Rev. Entomol. 33:337-366.
122. SSA. 2001. Secretaría de Salud [en línea] <http://www.salud.gob.mx/>
123. Strote, G., I. Bonow, M. Kromer, T. Rubio de Kromer, S. Attah & N. Opoku. 1988. Chemotherapy for onchocerciasis: results of in vitro experiments with promising new compounds. Trop. Med. Int. Health. 3:397-407.
124. Tada, I., M. Korenaga, K. Shiwaku, E. O. Ogunba, G. O. Ufomadu & B. E. Nwoke. 1987. Specific serodiagnosis with adult *Onchocerca volvulus* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36:383-386.
125. Taylor, H. R., L. E. Keyvan, H. S. Newland, A. T. White & B. M. Greene. 1987. Sensitivity of skin snips in the diagnosis of onchocerciasis. Trop. Med. Parasitol. 38:145-147.
126. Taylor, H. R., B. Munoz, E. Keyvan-Larijani & B. M. Greene. 1989. Reliability of detection of microfilariae in skin snips in the diagnosis of onchocerciasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41:467-471.
127. Taylor, M. J. & A. Hoerauf. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. Parasitol. Today. 15:437-442.
128. Toè, L., C. Back, A. G. Adjami, J. M. Tang & T. R. Unnasch. 1997. *Onchocerca volvulus*: comparison of field collection methods for the preservation of parasite and vector samples for PCR analysis. Bull. World Health Organ. 75:443-447.
129. Toè, L., A. Merriweather & T. R. Unnasch. 1994. DNA probe-based classification of *Simulium dammosum* s.l. borne and human-derived filarial parasites in the Onchocerciasis Control Program area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51:676-683.
130. Toè, L., J. M. Tang, C. Back, C. R. Katholi & T. R. Unnasch. 1997. Vector-parasite transmission complexes for onchocerciasis in West Africa. Lancet. 349:163-166.
131. Trenholme, K. R., T. I. M. Tree, A. J. Gillespie, R. Guderian, R. M. Maizels & J. E. Bradley. 1994. Heterogeneity of IgG antibody responses to cloned antigens in microfilaridemia positive individuals from Esmeraldas province Ecuador. Parasite. Immunol. 16:201-209.
132. Unnasch, T. R. & S. E. O. Meredith. 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.
133. Vázquez-Castellanos, J. L. 1991. Cafeticultura e historia social de la oncocercosis en el Soconusco, estado de Chiapas, México. Salud Pública Mex. 33:124-135.
134. Vincent, J. A., S. Lustigman, S. Zhang & G. J. Weil. 2000. A comparison of newer tests for the diagnosis of onchocerciasis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 94:253-258.
135. Walsh, J. F., J. B. Davies, L. E. Le Berre & R. Garms. 1978. Standardization of criteria for assessing the effects of *Simulium* control in onchocerciasis control programmes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:675-676.
136. Wandji, K., J. Y. Cesbron, C. Dissous, D. W. Taylor, A. Haque, C. Lutsch & A. Capron. 1990. Use of monoclonal antibodies for the characterization of *Onchocerca volvulus* antigens. Trop. Med. Parasitol. 41:13-19.
137. Weil, G. J., C. Steel, F. Liftis, L. Ben-Wen, G. Mearns, E. Lobos & T. B. Nutman. 2000. A rapid-format antibody card test for diagnosis of onchocerciasis. J. Infect. Dis. 182:1796-1799.
138. Weiss, N. & M. Karam. 1989. Evaluation of a specific enzyme immunoassay for onchocerciasis using a low molecular weight antigen fraction of *Onchocerca volvulus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40:261-267.
139. Whitworth, J., M. D. Downham, M. D. Lahai & Maude. 1996. A community trial of ivermectin for onchocerciasis in Sierra Leona: compliance and parasitological profiles after three and a half years of intervention. Trop. Med. Int. Health. 1:52-58.
140. Whitworth, J. 1998. Onchocerciasis. In microbiology and microbial infections (ed. F. E. G. Cox, J. P. Kreier, D. E. V. P., Wakelin, L., Collier, A., Balows y Sussman M. G. E.). Topley y Wilson's (Arnold), London, U.K.
141. Woodruff, A.W., D. P. Choyce, F. Muci-Mendoza, M. Hills & L. E. Pettit. 1966. Onchocerciasis in Guatemala: a clinical and parasitological study with comparisons between the disease there and in East Africa. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60:707-719.
142. World Health Organization. 1995. Onchocerciasis and its control. Technical Report Series 852.
143. World Health Organization. 1995. Onchocerciasis control programme in West Africa. Geneva.
144. World Health Organization. 1987. Third report of the WHO expert committee on Onchocerciasis. Geneva.
145. Yamedgo, L., L. Toè, J. M. Hougard, B. A. Boatin & T. R. Unnasch. 1999. Pool screen polymerase chain reaction for estimating the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium dammosum* sensu lato: results of a field trial in an area subject to successful vector control. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:124-128.
146. Zimmerman, P. A., K. Y. Dadzie, G. De Sole, J. Remme, E. S. Alley & T. R. Unnasch. 1992. *Onchocerca volvulus* DNA probe classification correlates with epidemiologic patterns of blindness. J. Infect. Dis. 165:964-968.
147. Zimmerman, P. A., R. H. Guderian, E. Araujo, L. Elson, P. Phadke, J. Kubofcik & T. B. Nutman. 1994. Polymerase chain-reaction based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. J. Infect. Dis. 169:686-689.
148. Zimmerman, P. A., L. Toè & T. R. Unnasch. 1993. Design of *Onchocerca* DNA probes based upon analysis of a repeated sequence family. Mol. Biochem. Parasitol. 58:259-267.
149. Zimmerman, P. A., C. R. Katholi, M. C. Wooten, U. N. Lang & T. R. Unnasch. 1994. Recent evolutionary history of American *Onchocerca volvulus*, based on analysis of a tandemly repeated DNA sequence family. Mol. Biol. Evol. 11:384-392.

## Correspondencia:

**Prof. Dr. Mario A. Rodríguez-Pérez**  
 Centro de Biotecnología Genómica  
 Instituto Politécnico Nacional  
 Boulevard del Maestro esquina Elías Piña  
 Col. Narciso Mendoza 88710,  
 Reynosa, Tamaulipas.  
 E-mail: mrodriguez@ipn.mx