

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**FACULTAD DE CIENCIAS APLICADAS
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

“Determinación por PCR-ELISA de la reducción de la tasa de infección natural de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas”

RESUMEN FINAL

ELABORADO POR:

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

DIRECTOR: Dr. Ph.D. Marcelo Grijalva

CODIRECTOR: Dr. Carlos Torres

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DEL 2006

RESUMEN

La oncocercosis, conocida también como “Ceguera de los Ríos” es una enfermedad infecciosa producida por el parásito *Onchocerca volvulus* y caracterizada por lesiones en la piel, nódulos fibrosos, lesiones oculares con pérdida de la capacidad visual y ceguera progresiva. Según la Organización Mundial de la Salud es considerada la segunda causa de ceguera en el mundo. Se encuentra presente en 34 países, 27 África, 1 en la península Arábiga (Yemen) y 6 en América, existen 18 millones de personas infectadas, 800.000 con trastornos oculares y 270.000 ciegos.

Las primeras informaciones sobre la presencia de oncocercosis en el Ecuador, datan de 1952 por Luis A. León, en el año de 1976, Guderian y en 1980, Carvajal y Zerega reportan oficialmente un caso en la zona norte de la provincia de Esmeraldas, el mismo que es confirmado como oncocercosis. El Ministerio de Salud Pública reconoce la existencia de un foco oncocercótico en la provincia, constituyéndose Ecuador en el sexto país endémico en la región, junto a Guatemala, México, Venezuela, Brasil y Colombia. Entre los años de 1980 y 1986 existió un incremento de la enfermedad en un 73% siendo los más afectados los grupos étnicos de afroecuatorianos, indígenas Chachi y en menor cantidad, mestizos e indígenas Tsáchilas.

Ecuador entonces, al formar parte de la Iniciativa Regional representada por el Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA),

organismo que norma y vigila el trabajo de los seis países de la región, ha adoptado como principal estrategia de control y de eliminación de la enfermedad, la administración en forma masiva y semestral de ivermectina (Mectizan®), en toda el área endémica. La ivermectina es un microfilaricida eficaz apropiado para su uso rural en gran escala. La meta es la eliminación de la morbilidad de la infección por *O. volvulus* para el año 2007 y la interrupción de la transmisión del parásito en los focos o países donde fuera factible.

El Programa en Ecuador realiza estudios periódicos de investigación en parasitología, oftalmología y entomología, conocidos como Evaluaciones Epidemiológicas a Profundidad (EEP) para evaluar el impacto de la distribución del fármaco en la reducción de la prevalencia de la enfermedad. Se cree que existen aproximadamente 25.000 personas en riesgo, es decir el 4.6% del total de la población de la región.

Las evaluaciones entomológicas en cada una de las comunidades centinela, que son comunidades hiperendémicas que presentaban en un principio 60% o más casos de personas portadoras de microfilarias es decir contagiadas con oncocercosis, consisten en realizar capturas de alrededor de 10.000 moscas vectoras del género *Simulium* durante la época de mayor densidad y transmisión del parásito, con el fin de determinar la presencia de los estadios larvarios L1, L2 o L3 de *O. volvulus*. Con los avances de la biología molecular y el desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y utilización de sondas específicas de ADN para *O. volvulus*, los estudios

vectoriales han permitido examinar un número de moscas notablemente mayor en menor tiempo del que se examinaba con la técnica de disección tradicional.

La prevalencia de moscas infectivas en las tres comunidades centinela El Tigre, Corriente Grande y San Miguel del foco endémico principal del río Cayapas en la provincia de Esmeraldas fueron estimadas por medio de la técnica de PCR-ELISA y el programa PoolScreen, como parte de una evaluación epidemiológica a profundidad del Programa Nacional de Eliminación de la Oncocercosis Ecuador (PNEO-E).

La metodología PCR-ELISA que se utilizó fue del Protocolo Completo para el Análisis de O-150 PCR en moscas negras infectadas con *O. volvulus*, según Unnasch, 2005 y el Sistema de Amplificación de ELISA de Invitrogen.

Este es un método de diagnóstico molecular altamente sensible y específico y una herramienta biotecnológica muy útil como estrategia de control para determinar la reducción en la transmisión de infección de las moscas negras vectoras del género *Simulium* y la posible eliminación de la enfermedad en toda el área endémica. Este método consta de tres fases principales Extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa y Enzyme- Linked Immunosorbent Assay.

Con la finalidad de monitorear la principal estrategia de control de la enfermedad, el impacto del tratamiento por medio de la distribución masiva del

fármaco Ivermectina (Mectizan®), se realizó un estudio epidemiológico transversal para en un momento determinado medir la prevalencia de la exposición y del efecto en una muestra poblacional designada. Además se realizó un estudio longitudinal comparativo entre los datos obtenidos en esta investigación con anteriores estudios, lo que permite detectar variaciones a través del tiempo.

De las 35.351 moscas analizadas por PCR-ELISA, es decir 706 grupos o “pools” en las tres comunidades centinela, se obtuvieron siete positivas es decir una tasa global de aproximadamente 2 moscas infectivas por cada 10.000 analizadas, resultados que comparados con estudios anteriores demuestran una reducción numérica entre las tasas de infectividad por medio de un análisis descriptivo.

Los datos actuales obtenidos, comparados también con los de 1996 revelan una dramática reducción en las tasas de infectividad y el proceso de transmisión de la enfermedad, son ocho años de distribución semestral ininterrumpida del fármaco, mientras que los datos actuales comparados con los estudios del año 2000, resultan estadísticamente no significativos, al obtenerse valores de $p > 0.05$ dentro del rango del error muestral permitido en el análisis inferencial, lo que quiere decir que la reducción en el proceso de transmisión de la enfermedad durante esos cuatro años es mínimo.

Con el presente estudio de investigación se rechazó entonces, la hipótesis de que la tasa de infección natural de las principales especies vectoras de

Onchocerca volvulus, presenta una reducción, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las tres comunidades centinela El Tigre, Corriente Grande y San Miguel del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas, determinadas mediante la técnica PCR-ELISA, ya que se cree que después de tantos años de tratamiento el fármaco talvez no presenta igual eficacia, se puede confirmar también la gran capacidad vectorial de las principales especies transmisoras y el alto grado de contacto huésped-vector en esta área.

Es necesario investigar las causas de la falta de reducción en las tasas de infectividad obtenidas y una posible resistencia del parásito al fármaco.

Con respecto a la técnica es recomendable utilizar PCR-ELISA en posteriores análisis ya que es un método de diagnóstico altamente sensible y específico.

CAPÍTULO I

MARCO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes y Planteamiento del Problema

La oncocercosis, conocida también como “Ceguera de los Ríos” es una enfermedad infecciosa crónica producida por el parásito *Onchocerca volvulus* y caracterizada por lesiones desfigurantes en la piel, presencia de nódulos fibrosos, serias lesiones oculares con pérdida de la capacidad visual y ceguera progresiva. Según la Organización Mundial de la Salud es considerada la segunda causa de ceguera en el mundo ¹.

Las primeras informaciones sobre la presencia de oncocercosis en el Ecuador, datan de 1952 por Luis A. León, y en el año 1976, Guderian y colaboradores confirman la presencia de un caso en una indígena Chachi de la provincia de Esmeraldas. Sin embargo en 1980, Carvajal y Zerega reportan oficialmente al Instituto Nacional de Higiene del Ecuador, un caso en la zona norte de la provincia de Esmeraldas, el mismo que es confirmado como oncocercosis. El Ministerio de Salud Pública reconoce oficialmente ese mismo año la existencia de un foco oncocercótico en la provincia de Esmeraldas, constituyéndose Ecuador en el sexto país endémico con oncocercosis en la región de las Américas, junto con Guatemala, México, Venezuela, Brasil y Colombia ⁴.

Estudios realizados en la década de los ochenta demostraron un aumento en la prevalencia de la infección, en 1980 fue de un 29.3% y en 1986 de un 50.7%, teniendo un incremento del 73% en relación a la población total del área

endémica. Es entonces en la década de los años 80 y 90 que se estudian las áreas consideradas de riesgo para oncocercosis y se circunscribe el foco endémico, registrándose en la actualidad 119 comunidades endémicas ¹⁹.

La composición étnica del foco endémico de oncocercosis en la provincia de Esmeraldas consiste principalmente de dos grupos: la nacionalidad indígena Chachi y el pueblo Afroecuatoriano. En los últimos años se han reportado también casos en la población mestiza y en el grupo indígena de los Tsachilas²⁰.

Ecuador ha adoptado como principal estrategia de control y de eliminación de la enfermedad, la administración en forma masiva y semestral de ivermectina (Mectizan®), en toda el área endémica. La ivermectina es un microfilaricida eficaz y un microfilárico temporal apropiado para su uso rural en gran escala, que ha abierto la perspectiva de eliminar la oncocercosis en muchas de las áreas endémicas. Esta estrategia, adoptada mundialmente, ha permitido que los seis países que forman la Iniciativa Regional en las Américas, tengan como meta la eliminación de la morbilidad resultante de la infección por *O. volvulus* para el año 2007 y la interrupción de la transmisión del parásito en los focos o países donde fuera factible, es decir, la eliminación de la enfermedad ¹⁷.

El Programa en Ecuador realiza estudios periódicos de investigación en parasitología, oftalmología y entomología, conocidos como Evaluaciones Epidemiológicas a Profundidad (EEP) para evaluar el impacto de la distribución del fármaco en la reducción de la prevalencia de la enfermedad ¹⁷.

1.2 Justificación

Ecuador forma parte de la Iniciativa Regional representada por el Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA), organismo multiagencial que norma y vigila el trabajo de los seis países de la región.

Una de las principales actividades es la de determinar en cada uno de los países endémicos el comportamiento de la enfermedad tras el tratamiento con ivermectina, por lo que se realiza periódicamente en las comunidades centinelas del área endémica las Evaluaciones Epidemiológicas a Profundidad (EEP). Estas evaluaciones se realizan en las tres comunidades evaluadas antes de la primera ronda de tratamiento con el fármaco, donde se reportaron tasas de infectividad sobre 70 por 10.000 moscas analizadas y luego cada cuatro años, se cree que existen aproximadamente 25.000 personas en riesgo, es decir el 4.6% del total de la población de la región. Las tres comunidades centinela de El Tigre, San Miguel y Corriente Grande son consideradas comunidades hiperendémicas ya que presentaban en un principio un 60% o más casos de personas portadoras de microfilarias, es decir personas contagiadas con oncocercosis. En la actualidad este trabajo se viene realizando periódicamente en las comunidades de toda el área endémica, con el fin de obtener datos que permitan demostrar el impacto de las estrategias en áreas extracentinela en donde antes no se han realizado estudios evaluativos, además de demostrar la reducción o interrupción de la transmisión del parásito en el resto del área endémica, estudios que permitan certificar la eliminación de la enfermedad en el país.

Las evaluaciones entomológicas en cada una de las comunidades centinelas, en las que se basa esta investigación, consisten en realizar capturas de alrededor de 10.000 moscas vectoras del género *Simulium* durante la época de mayor densidad y transmisión del parásito, con el fin de determinar la presencia de los estadios larvarios L1, L2 o L3 de *O. volvulus*. La técnica de disección individual de las moscas para la observación de los parásitos a través de un microscopio óptico y la determinación de las tasas de infección e infectividad natural, fue utilizada en un principio para los estudios de monitoreo. Luego con los avances de la biología molecular y el desarrollo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y utilización de sondas específicas de ADN para *O. volvulus*, los estudios vectoriales han permitido examinar un número de moscas notablemente mayor en menor tiempo del que se examinaba con la técnica de disección. Esto proporciona un menor costo, procesamiento del material en menor tiempo y una prueba con mayor sensibilidad debido a que detecta el material genético específico de *O. volvulus*.

La metodología PCR-ELISA combinado, al no haber sido utilizada antes como herramienta biotecnológica en determinar la interrupción de la transmisión de *O. volvulus*, brinda valiosos aportes para el desarrollo de la capacidad investigativa en el país. La estandarización de dicha técnica proporciona un fin práctico e innovativo como estrategia de control para determinar la prevalencia de infección e infectividad de los vectores de esta enfermedad, además estos datos pueden ser comparados con estudios de infección que se han obtenido en anteriores investigaciones y permitir un monitoreo más eficiente de la prueba determinando la reducción en la tasa de infección.

En el último estudio de EEP en el año 2000, la técnica de PCR fue utilizada con visualización en geles de agarosa. Actualmente a nivel regional se complementa la técnica PCR con una visualización colorimétrica utilizando ELISA, ya que ésta brinda algunas ventajas sobre los geles de agarosa, utilizando cantidades mínimas diluidas de ADN.

El ensayo ELISA es alrededor de 100 veces más sensible que la visualización en gel y posee la ventaja de no necesitar un monitoreo exhaustivo ya que el ensayo puede ser optimizado. En el caso del gel de agarosa se usa una cantidad bastante grande de ADN de moscas en la reacción de PCR, la que podría dejar una gran cantidad de barrido en su fondo, mientras que en el ensayo PCR-ELISA se tiene una mayor especificidad ya que se utiliza una prueba fluorescente específica para *O. volvulus*.

Con la técnica PCR-ELISA se puede analizar una mayor cantidad de muestras con un tiempo de procesamiento más corto, brinda mayor seguridad al investigador, además de arrojar resultados confiables gracias a que podemos contar con controles negativos y controles positivos con diferentes diluciones que determinan la eficiencia de la prueba. Con un adecuado y cuidadoso tratamiento de las muestras y la repetición de un ensayo al azar se puede realizar un control de calidad eficiente de la prueba.

Finalmente, es de interés del Programa Nacional de Eliminación de la Oncocercosis en el Ecuador, organismo del Ministerio de Salud Pública, el determinar la reducción de la transmisión del parásito por parte de las especies vectoras de simúlidos en el área del Río Cayapas, en donde hasta el año 2000 existió una positividad de alrededor de 4 moscas infectivas por cada 10.000

analizadas. Esto permitirá al Programa analizar los resultados y el desarrollo de las estrategias hasta el momento implementadas, con el fin de mantener o ejecutar nuevas actividades para alcanzar en el menor tiempo posible la interrupción de la transmisión y eliminación de la enfermedad en esta área.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar por PCR-ELISA la reducción de las tasas de infección natural de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la Tasa de Infectividad de las moscas negras vectoras de *O. volvulus* en las tres comunidades centinela del río Cayapas: El Tigre, San Miguel y Corriente Grande.
- Monitorear el impacto del tratamiento sostenido en el área oncocercótica del río Cayapas sobre el proceso de transmisión, a través de las evaluaciones entomológicas para la eventual certificación de eliminación de la enfermedad.
- Estandarizar para Ecuador el protocolo completo para el análisis de *Onchocerca volvulus* PCR-ELISA en moscas negras infectadas con *O. volvulus*, técnica adoptada a nivel regional en Las Américas.

1.4 Hipótesis

La tasa de infección natural de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, presenta una reducción, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las tres comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas, determinadas mediante la técnica PCR-ELISA.

1.5 Definición y Operacionalización de Variables

Impacto del Tratamiento: Se determinará la reducción de la Tasa de Infectividad de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, con lo que se demostrará el impacto del tratamiento masivo con Ivermectina (Mectizan®) en las tres comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas ⁵¹.

Tabla 1.1: Definición de Variables

| Variable | Dimensión | Indicador | Escala |
|-------------------------|--|--|--------|
| Impacto del Tratamiento | Aplicación de la técnica estandarizada adaptada a las moscas negras sudamericanas infectadas con <i>O. volvulus</i> (UNNASCH, T., 2005). | Tasa de Infectividad (TI): Presencia de larvas L3 en la cabeza del Simúlido. | % |

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1 La Oncocercosis

2.1.1 Características Generales

La oncocercosis humana es una enfermedad vectorial causada por la infección con el parásito *Onchocerca volvulus*, nemátodo del grupo de las filarias, cuyos gusanos adultos se encuentran enrollados y encapsulados en el tejido conectivo superficial o profundo del cuerpo humano formando nódulos fibrosos que caracterizan la enfermedad. El gusano hembra adulto puede llegar a medir más de 100cm., mientras que el gusano macho mide alrededor de 3 a 5cm ²¹.

Los gusanos hembras una vez que han sido fecundados producen miles de formas embrionarias conocidas como microfilarias, que son aquellas que saliendo del nódulo van a la capa dérmica y subdérmica de la piel y al tejido ocular, causando las manifestaciones clínicas de la enfermedad ²⁸.

A la oncocercosis se la conoce también como “Ceguera de los ríos”, porque tanto el huésped como el vector se relacionan con ríos de agua caudalosa. El ser humano se asienta en las riveras de los ríos y el vector desarrolla su ciclo vital totalmente en el agua ²⁸.

Esta enfermedad es considerada como un problema de salud pública ya que está presente en 34 países, 27 en África, uno en la península Arábiga (Yemen) y 6 en las Américas, existiendo 123 millones de personas en el mundo que viven en estas áreas endémicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS)

reporta 18 millones de personas infectadas, 800.000 con trastornos oculares graves y 270.000 ciegos ⁵⁴.

En la Región de las Américas, existe una población en riesgo de 505.854 personas, en los que México, Guatemala y Venezuela aportan con el 93.4%, mientras que Colombia, Ecuador y Brasil con el 6.6%. Ecuador tiene aproximadamente 25.000 personas en riesgo, es decir el 4.6% del total de la región ⁵⁵.



Figura 2.1: Distribución de la oncocercosis en América Latina (OEPA, 2000).

2.1.2 Situación en Ecuador

En el Ecuador no se conoce con certeza desde cuándo la enfermedad está presente, se supone que al igual que en América Central, llegó con los esclavos negros traídos desde el África, en donde los más importantes flujos de esclavos se dieron a mediados del siglo XVII, a inicios del siglo XIX y a inicios del siglo XX. Probablemente el primer caso de oncocercosis en el Ecuador fue reportado por León en 1952 en un nódulo extraído a una monja que vivió en la Costa. Luego Guderian y colaboradores en 1976 describen el parásito en una persona de la etnia Chachi y en 1977 se diagnosticó oncocercosis en un niño del área de Quinindé en el que se sospechaba de nódulos tuberculosos ²⁹.

En el año 1980, se reconoció oficialmente el primer caso de oncocercosis en la literatura nacional descrita por Carvajal y Zerega, en un paciente proveniente de la zona norte de Esmeraldas. El área endémica de oncocercosis en el Ecuador se ubica en las provincias de Esmeraldas y Pichincha ⁴. Hay un foco principal y seis focos que se han denominado satélites en los ríos Canandé, Viche, Verde, Sucio y Tululví en la provincia de Esmeraldas y las comunidades de Cóngoma y Chiguilpe en el cantón Santo Domingo de los Colorados, provincia de Pichincha ¹⁸.

El foco principal está ubicado en la cuenca del Río Santiago formada por los ríos Cayapas, Santiago, Onzole y sus tributarios en la provincia de Esmeraldas, comprende 99 (83%) de las 119 comunidades endémicas del país. Aquí residen 18,796 personas de las cuales 16,217 son elegibles para tratamiento ⁵².

Las restantes 20 comunidades, están distribuidas en los seis focos satélites distribuidos en las provincias de Esmeraldas y Pichincha, en donde residen 5,582 personas de las cuales 4,730 son elegibles para tratamiento. Un total de 24,378 habitantes constituye la población en riesgo ⁵².

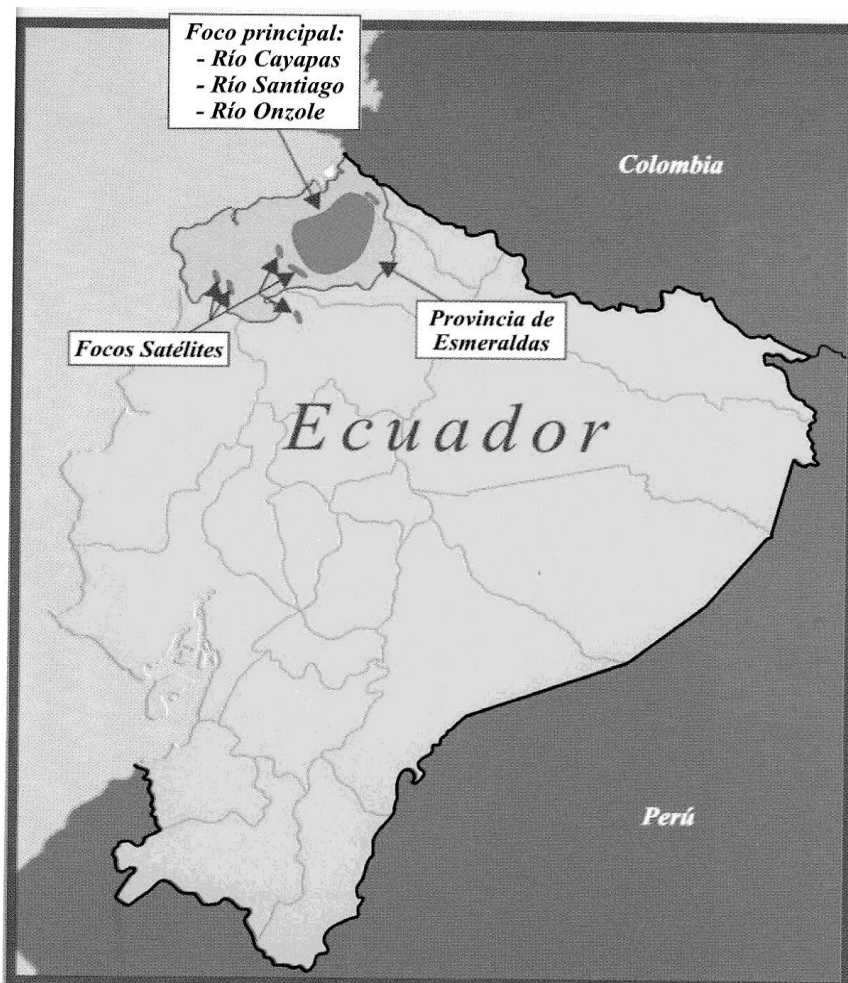


Figura 2.2: Distribución de la oncocercosis en Ecuador (OEPA, 2003).

2.1.3 Patología y Manifestaciones Clínicas

La patología producida por los parásitos adultos consiste en nódulos subcutáneos llamados oncocercomas. Estos están formados por una cápsula fibrosa periférica, una zona intermedia fibrosa con células vascularizadas y en el centro los parásitos enrollados. Después de muerto el parásito, el nódulo se vuelve más fibroso ².

Los oncocercomas se demoran aproximadamente un año en aparecer y crecen lentamente. Estos tumores son benignos, de tamaño variable, generalmente de 1 a 2 cm. Inicialmente son blandos y con el tiempo se vuelven duros por la fibrosis, a veces de forma irregular y no son dolorosos. El número de nódulos por paciente varía de 2 a 5, pero algunos poseen hasta 100 o más, según el grado de infección. No existen signos visibles de inflamación a nivel del nódulo, excepto cuando hay infección secundaria y no están adheridos a la piel. Su localización puede ser en cualquier parte del cuerpo, con predominio sobre prominencias óseas, existiendo diferencias en su localización de acuerdo a las zonas geográficas. En África tienen cierta predilección por la región pélvica, muslos y brazos. En América, en los países centroamericanos de Guatemala y México se encuentran distribuidos en la cabeza y en el tronco. En Ecuador, el 40% de los nódulos se localizan sobre la cresta ilíaca ².

Las microfilarias producidas por el gusano hembra adulto, producen lesiones dérmicas llamadas dermatitis como principal manifestación clínica, asociada o no a los nódulos. Esta dermatitis crónica es populosa y se la ha denominado sarna filariana. La causa de esta dermatitis se ha atribuido a la movilización de las microfilarias por la dermis y a reacción alérgica. Esta dermatitis es más frecuente en niños como una etapa inicial de la enfermedad ².

Las características clínicas son variables, con atrofia epidérmica, descamación, cambios de color, prurito y edema; existen formas liquenoides con la piel engrosada e hiperpigmentada y también dermatitis eczematosa. Se describe como "mal morado" y "erisipela de la costa" en algunas partes del mundo ².

Alrededor de las microfiliarias muertas se forma un granuloma o un infiltrado de eosinófilos, En sangre periférica se puede encontrar entre 15 y 50% de eosinófilos. Las microfilarias invaden los ganglios linfáticos que se vuelven fibrosos y la obstrucción linfática, con linfadenitis, puede causar elefantiasis. En la región inguinal se observa, en algunos casos, un crecimiento colgante. ²

Las microfiliarias tienen una tendencia a invadir el globo ocular y producen la patología oftálmica, que finalmente puede llevar a la ceguera. El compromiso principal se encuentra en el tracto uveal y cámara anterior. La patogenia de las lesiones oculares se atribuye a la acción directa de los microfiliarias, a sus productos tóxicos liberados al morir y a una reacción de hipersensibilidad. En la conjuntiva producen infiltrado de plasmocitos y eosinófilos, así como cambios vasculares ².

Las lesiones corneales se observan como una queratitis punctata o queratitis esclerosante. La sintomatología se caracteriza por fotofobia, lagrimeo y sensación de cuerpo extraño. Las microfilarias que logran pasar al segmento posterior del ojo, invaden el nervio óptico y la retina presentando disminución progresiva de la visión, que puede terminar en ceguera completa ².

2.1.4 Diagnóstico

La orientación inicial hacia el diagnóstico se hace con la historia epidemiológica sobre la procedencia del paciente, si está geográficamente relacionado a las zonas endémicas o no endémicas de oncocercosis, la presencia de nódulos subcutáneos, dermatitis, lesiones oculares y eosinofilia, llevan a la sospecha clínica de la enfermedad. Esta se puede confirmar con algunos procedimientos como biopsia de piel, biopsia de nódulo, prueba de mazzotti, observación de microfilarias en el ojo, pruebas moleculares, entre otras ².

2.1.4.1 Biopsia de Piel

Es un método sencillo que toma la parte superficial de la epidermis, lo cual puede realizarse sin anestesia, utilizando una pinza esclerocorneal de Stolz. La muestra se debe tomar de la piel cercana a los nódulos si es que estos existieran. En caso de no haber nódulos debe preferirse la región escapular, prominencias óseas como la piel de la cresta ilíaca y la piel de los muslos ².

La biopsia de piel es colocada en un pocillo de una placa de microelisa de fondo plano con solución salina al 0.9%. Se la deja reposar de 12 a 24 horas, para posteriormente ser revisada bajo un microscopio invertido. En ese lapso de tiempo, las microfilarias salen de la biopsia de piel y son identificadas por su gran movilidad ².

2.1.4.2 Biopsia de nódulo

El estudio anatomopatológico tanto macro como microscópico puede revelar la presencia de parásitos adultos y las formas embrionarias en el útero de los gusanos hembras ².

2.1.4.3 Prueba de Mazzotti

Consiste en la administración de una dosis única de dietilcarbamazina, la cual produce en el paciente prurito de palmas y plantas y una reacción alérgica por destrucción de microfilarias, localizada en cara y cuello, a lo cual le sigue la presencia de edema, fiebre y malestar general; estos síntomas son acentuados a las 24 horas y desaparecen en 4 ó 5 días, sin dejar secuelas ².

2.1.4.4 Observación de microfilarias en el ojo.

Utilizando instrumentos oftalmológicos como la cámara de hendidura se pueden detectar microfilarias móviles en cámara anterior ².

2.1.4.5 Pruebas moleculares / inmunológicas

Existe un sin número de pruebas moleculares altamente específicas y sensibles que son utilizadas para detectar la presencia del parásito *Onchocerca volvulus*. Estas pruebas ayudan a confirmar el diagnóstico de la enfermedad, entre las más destacadas se puede mencionar: inmunofluorescencia indirecta, inmunolectroforesis, hemaglutinación indirecta, PCR-ELISA entre otras ⁴⁰.

2.1.4.5.1 PCR-ELISA

La técnica del PCR-ELISA combinado es en la actualidad el mejor y más sensible método de detección de la presencia de larvas de *O. volvulus*, en las moscas negras vectoras del género *Simulium*³⁴.

La metodología del PCR-ELISA consta de tres fases principales: Extracción del material genético ADN, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)¹⁶.

2.1.4.5.1.1 Extracción de ADN

La aplicación de las diferentes técnicas empleadas en Biología Molecular, entre ellas PCR-ELISA para el análisis del genoma, depende de la habilidad para obtener ADN con alto rendimiento y de muy buena calidad¹⁶.

Uno de los problemas en la extracción de ADN parasitario de *Onchocerca volvulus* es que se encuentra dentro de la composición del exoesqueleto del insecto, lo cual dificulta el acceso al interior para extraer el ADN del parásito, por lo que se debe primero triturar a la mosca para liberar los constituyentes celulares internos. Ello se hace generalmente por acción mecánica, macerando al insecto. Posteriormente, las membranas celulares deben destruirse de manera que el ADN sea liberado dentro del buffer, solución tampón de extracción, en presencia de detergentes y soluciones de baja o alta fuerza iónica. El ADN es menos soluble en soluciones de fuerza iónica intermedia de 0.4 a 0.8M. Es importante asegurarse que una cantidad significativa de ADN no sea atrapada en los desechos o restos celulares y que el ADN esté

completamente dissociado de proteínas y otros contaminantes que podrían interferir con el subsecuente análisis. El ADN debe ser protegido de la acción de enzimas (nucleasas), para este propósito se usan detergentes como el Ácido etilendiamintetracético, EDTA, agente que une iones de magnesio, el cual es considerado un cofactor necesario para la mayoría de las nucleasas ²².

Después de la incubación inicial, las proteínas desnaturalizadas y la mayoría de los carbohidratos son removidos al emulsificar la mezcla buffer/tejido con fenol. Se realiza una etapa adicional de cloroformo para agudizar la fase de separación entre los solventes orgánicos y la fase acuosa ²².

Finalmente, hay que separar el ADN de la fase acuosa, para lo cual se debe precipitar el mismo, usando etanol. Después de precipitado el ADN se disuelve en agua bidestilada caliente ²².

Otra consideración importante en el aislamiento del ADN parasitario es la contaminación de la muestra con proteínas no removidas durante el proceso de extracción las cuales afectan la pureza del ADN. Estas proteínas pueden inhibir la actividad de algunas enzimas, pudiendo interferir con la concentración del ADN obtenido. Para prevenir tal contaminación debe tenerse en cuenta que la base para la separación de las proteínas de los ácidos nucleicos es su diferente solubilidad en presencia de detergentes o tampones con altas concentraciones (0.5 a 3.0M) de NaCl ²².

Tabla 2.1: Principales reactivos empleados en la extracción de ADN de *O. volvulus*²².

| REACTIVO | CARACTERISTICA | FUNCION |
|--|---------------------|---|
| 1. Tris (hidroximetil amino metano) | Tampón biológico | Mantener estable el pH de la solución (pH: 7.0-8.0) |
| 2. EDTA (Etilen diamino tetra acético) | Agente quelante | Toma iones Mg ⁺⁺ |
| 3. Fenol | Solvente orgánico | Desnaturaliza proteínas |
| 4. Cloroformo | Solvente orgánico | Remueve lípidos, desnaturaliza proteínas, solubiliza al fenol y lo elimina de la solución |
| 5. SDS (Sodio dodecil sulfato) | Detergente aniónico | Solubiliza proteínas, tejidos y membranas. |
| 6. DTT (Ditriotreitol) | Antioxidante | Reduce grupos sulfuros de proteínas, baja concentración permite actividad enzimática. |
| 7. Solución Etanol | Alcohol | Precipitan Ac. Nucleicos (a bajas temperaturas) |
| 8. NaCl | Sales | Equilibran las fuerzas iónicas |

2.1.4.5.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR es una metodología *in vitro* utilizada para sintetizar enzimáticamente secuencias definidas de ADN. Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 y dentro de la biología molecular es muy utilizada para la detección de polimorfismos, marcación de sondas, secuenciación, entre otros. Adicionalmente su aplicación se extiende a áreas como diagnóstico médico, ciencia forense, microbiología, etc ³⁵.

La reacción usa una plantilla de ADN específica, dos oligonucleótidos, o cebadores comúnmente conocidos como “primers” que hibridizan a la cadena opuesta del ADN, los deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP’s), un buffer determinado y un equipo especial que permite cambios de temperaturas denominado Termociclador, que automatiza el procesamiento del PCR ³⁵.

La elongación de los “primers” esta catalizada por la *Taq* DNA polimerasa, que es una polimerasa termoestable aislada de una eubacteria termofílica llamada *Thermus aquaticus*. La mezcla de “primers”, ADN, dNTP’S y *Taq* es calentada para separar las cadenas del ADN que tiene la secuencia de interés, luego es enfriada para permitir que los “primers” encuentren la secuencia complementaria y se unan a ella, y para que la polimerasa extienda los “primers” para generar una nueva cadena ³¹. Series de calentamiento y enfriamiento multiplican el blanco en un millón de veces y para alcanzarlo, el número óptimo de ciclos depende de la concentración del ADN cuando otros parámetros están optimizados. Un error común es hacer muchos ciclos en un PCR, un número muy alto de ciclos puede incrementar la cantidad y complejidad de productos no específicos y pocos ciclos disminuyen el

producto. Se ha utilizado 5 ciclos en la primera amplificación y 35 ciclos en la segunda amplificación para resultados óptimos ¹³.

El procesamiento del PCR consta de tres fases principales: Denaturalización Inicial, Apareamiento del “Primer” y finalmente Extensión del producto ³⁵.

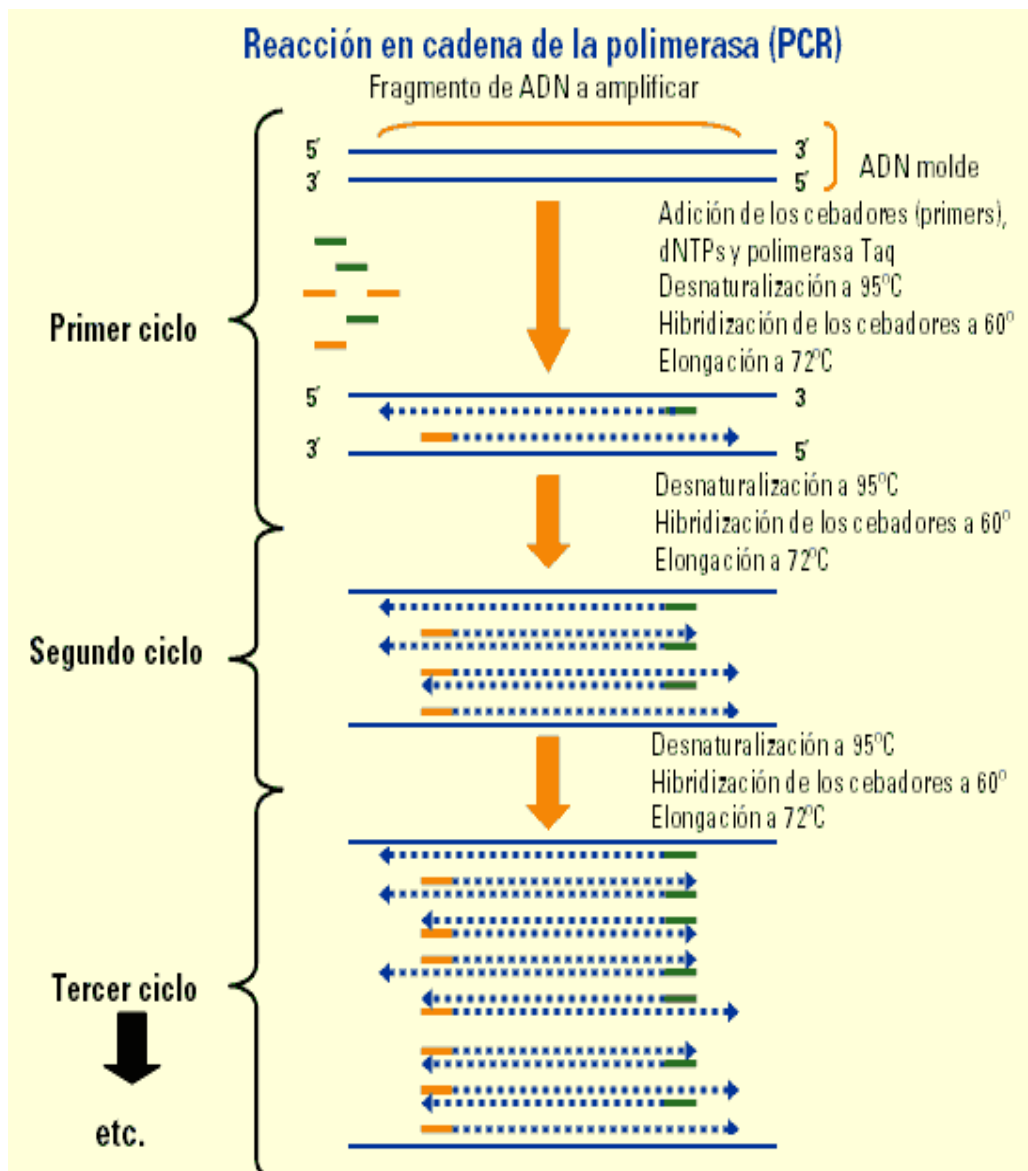


Figura 2.3: Diagrama del Proceso de PCR (ERLICH, 1992).

2.1.4.5.1.2.1 Denaturalización Inicial

Es importante denaturar la plantilla completamente. El calentamiento inicial de la mezcla de PCR se realiza durante un minuto a 94°C, tiempo suficiente para denaturar el ADN y permite que los “primers” puedan aparearse a la plantilla cuando la mezcla es enfriada ¹³.

Una denaturalización incompleta acarrearía un realineamiento de las cadenas y así una disminución en el producto. En contraste pasos largos de denaturación produciría pérdida en la actividad de la enzima ¹³.

2.1.4.5.1.2.2 Apareamiento del “Primer”

La elección de la temperatura de apareamiento es probablemente el factor más crítico en la búsqueda del PCR específico. Si la temperatura es muy alta no hay apareamiento, pero si es baja se producen apareamientos no específicos. La temperatura y la longitud del tiempo para el apareamiento dependen de la composición de las bases, longitud y concentración de los “primers”. Se ha utilizado dos minutos a 37° C ¹³.

2.1.4.5.1.2.3 Extensión del “Primer”

El tiempo de extensión depende de la longitud y la concentración de la secuencia y de la temperatura. Las extensiones son tradicionalmente hechas a 72°C, ya que esta es la temperatura óptima de la Taq DNA polimerasa. La vida media de la actividad de la Taq es más de dos horas a 92.5° C., 40 minutos a 95° C. y cinco minutos a 97.5° C ¹³.

Usualmente, 20 segundos de extensión es suficiente para amplificar fragmentos más pequeños que 500pb y 40 segundos para fragmentos mayores a 1.2kb. Sin embargo, esto puede variar ya que la Taq puede adicionar 60 bases por segundo a 72°C. Se utiliza 30 segundos a 72° C ¹³.

Después del último ciclo se realiza un último calentamiento a 72° C. por seis minutos para promover una extensión completa de los productos parcialmente extendidos ¹³. Este producto amplificado puede ser mantenido a 4° C. durante toda la noche o hasta el siguiente paso ⁴⁸.

2.1.4.5.1.3 Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

El inmunoensayo enzimático es una técnica en la cual uno de los reactivos, el anticuerpo o el antígeno, se fija a un soporte sólido antes de su interacción con el reactivo complementario. Debido a esta característica la técnica se describe como ELISA por sus siglas en inglés, Enzyme- Linked Immunosorbent Assay⁴⁷.

La técnica es muy versátil y por esto hay diversas variantes de la misma dentro de las cuales las más comunes son el ELISA directo, el ELISA indirecto y el ELISA “en sandwich” o de captura. En los ELISA directo e indirecto, el antígeno se adsorbe sobre la fase sólida de las placas de ELISA, placas de un plástico especial de 96 pocillos o módulos de 8 columnas por 12 filas ⁴⁷.

El procesamiento de ELISA es un método muy rápido, práctico, específico y sensible que detecta hasta un nanogramo (10^{-9} g.) de ADN y consta de cuatro fases principales: la primera, conjugación del anticuerpo con una enzima, la segunda, unión del antígeno a los pocillos, que se realiza con facilidad a la

superficie de plástico tratado y previamente sensibilizado de las placas que tienen gran afinidad por las proteínas. Una tercera fase, que es la formación de una o más capas de inmunocomplejos, en la que el antígeno de las muestras unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado. Este método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. La fase final, revelado de la reacción enzimática, donde se añade el sustrato enzimático y el amplificador en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría a 492nm en el lector de ELISA ⁴⁶.

El ELISA indirecto, es un inmunoensayo enzimático heterogéneo, en donde el primer anticuerpo a determinar se enfrenta a un antígeno que se encuentra unido a la fase sólida de los pocillos en la placa de ELISA. Luego de la incubación y lavado se agrega un segundo anticuerpo marcado con la enzima que posee especificidad para el primer anticuerpo. Después de un nuevo lavado se agrega el sustrato y el amplificador correspondiente y se determina la actividad enzimática, obteniéndose así una medida de la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra, por medio de una reacción coloreada que es fácilmente medida en un espectrofotómetro ⁴⁷.

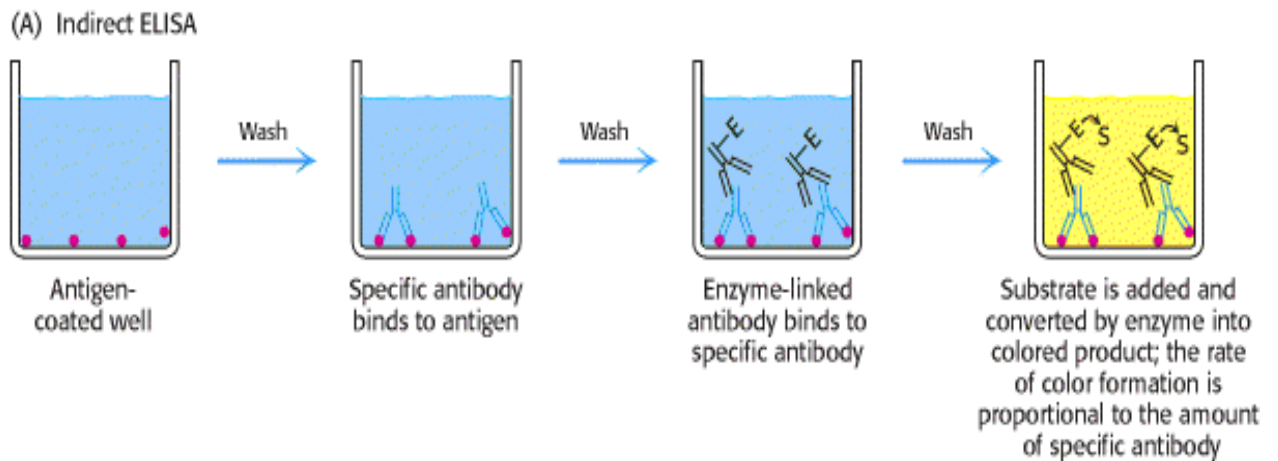


Figura 2.4: Proceso de ELISA indirecto (TALARO, 2002).

Las soluciones para dilución de los reactivos y lavado de los pocillos son variadas. El bloqueo de los pocillos es un paso muy importante en la técnica de ELISA, se debe utilizar soluciones de proteína ajenas al sistema antígeno-anticuerpo en estudio que satura los sitios no ocupados por el reactivo inmunológico usado, para forrar la superficie de los pocillos y evitar la adsorción inespecífica de reactivos en los pasos subsecuentes. Los anticuerpos de detección son anticuerpos dirigidos contra alguno de los reactivos que se encuentran acoplados a enzimas ⁴⁷.

Para el revelado del sistema se utiliza el sustrato de la enzima y a veces se requiere del uso simultáneo de un cromógeno, que es necesario para que el producto resultante tenga algún color, el cual se registra en un lector de ELISA a la longitud de onda (λ) de la máxima adsorción del producto coloreado. En otras ocasiones el cromógeno forma parte del sustrato ⁴⁷.

Los lectores de ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda, aquellas necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados ⁴⁶.

Se han ensayado numerosas fases sólidas para placas de ELISA, desde los antiguos tubos de cristal hasta las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado, con el fin de aumentar su capacidad de adsorción de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA ⁴⁶.

Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos, adecuados para los sistemas de muestreo masivo en sistemas robotizados ⁴⁶.

2.1.5 Ciclo de Transmisión del parásito *O. volvulus*

El hombre es definitivamente el único huésped de *O. volvulus* y la mosca negra del género *Simulium* su huésped intermediario. La mosca negra, al mismo tiempo que ingiere la sangre, toma microfilarias de la piel del ser humano infectado. Estas microfilarias ingeridas por la mosca junto con la alimentación de sangre del huésped, migran desde el abdomen y a través del hemocele llegan a los músculos torácicos de la mosca. En estos músculos el parásito no

solamente crece, sino que tiene cambios morfológicos, identificándose tres estadios larvarios conocidos como larva 1 (L1), larva 2 (L2), y larva 3 (L3), con dos ecdysis o “mudas”, requiriendo un tiempo aproximado de 5 a 10 días, luego de lo cual los estadios larvarios L3 de tipo filiforme, emigran a la probóscide en la cabeza de la mosca, quedando lista de esta manera para infectar al hombre en la siguiente alimentación. Una vez que estas larvas de estadio L3 infectivo hayan entrado en el organismo del ser humano, se produce una nueva muda a estadio larvario L4 dentro de los 3 a 7 días que se encuentra en el interior del huésped, alcanzando su estadio adulto en las siguientes 4 a 6 semanas ⁶.

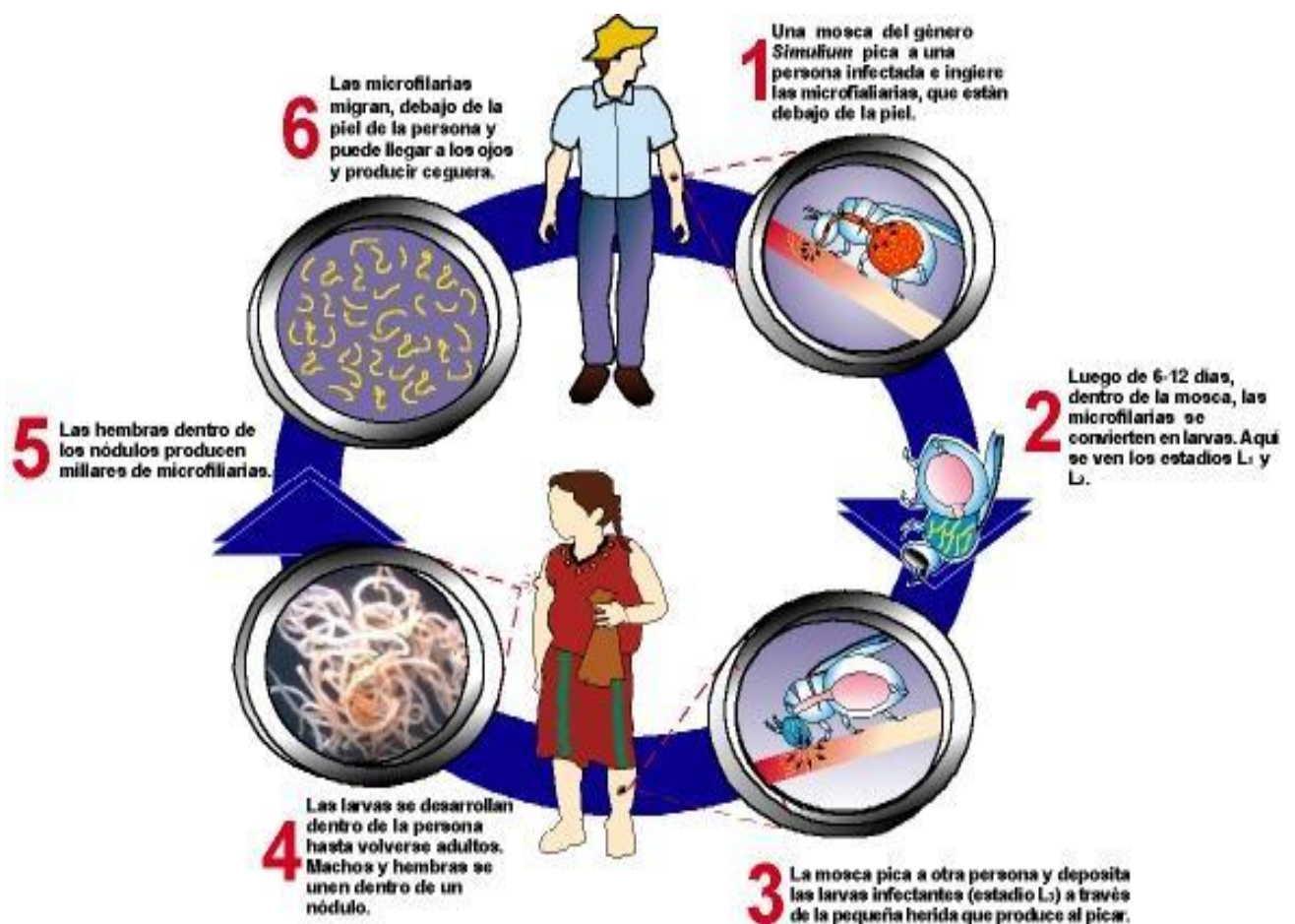


Figura 2.5: Ciclo de transmisión del parásito *Onchocerca volvulus* (OEPA, 2000).

Los gusanos adultos pueden aparearse y producir microfilarias 4-6 meses después de la infección, pero estas no son detectadas en la piel o los ojos sino hasta 14 o 16 meses después, el mismo lapso de tiempo en que los nódulos subcutáneos son detectados mediante palpación ⁶.

2.1.6 Vectores

Las moscas del género *Simulium*, son dípteros de cuerpo fornido y con una giba (1-5 mm de largo), aspecto morfológico característico, por lo que presentan un tórax arqueado corto, cuya coloración depende de la especie ⁷.

Poseen un par de alas acompañadas por un par de pequeñas protuberancias conocidas como elaterios, tienen patas con estructura tarsal de cinco segmentos y poseen piezas bucales cortas adaptadas para la succión de sangre como su principal alimento. Existen aproximadamente 1550 especies descritas, aunque se cree que muchas especies aún no han sido descubiertas⁷.

Su nombre común en español es mosca negra, jejen, mosca alazán, juro en el área endémica del Ecuador y con una connotación semicientífica, simúlido ⁷.

Estudios cromosómicos de los Simúlidos han permitido una clasificación en varios genotipos, formando un complejo de especies hermanas o citoespecies. Se ha encontrado que estos difieren en su comportamiento y preferencias alimenticias en los diferentes huéspedes. ⁵⁶ Esto va a afectar la importancia como vectores en la oncocercosis humana, en donde el factor más importante que influye en la diseminación del contagio humano con la infección de

Onchocerca volvulus, es la densidad de infección de los simúlidos, que a su vez depende del tamaño de la población y su contacto con el huésped; de la concentración de las larvas infectivas en estas moscas, de la longevidad de la hembra; de las variaciones climáticas y de la distancia de los sitios de procreación de las moscas con relación a los lugares residenciales ⁹.

Las especies implicadas en la transmisión de la enfermedad pertenecientes a las moscas del género *Simulium* en el Ecuador son: *S. exiguum*, el vector principal y *S. quadrivittatum*, el vector secundario ²⁷. Existen también otras especies de Simúlidos en Ecuador, *S. incrustatum*, *S. escomeli*, *S. bipunctatum*, entre otras, las cuales no muestran infección natural con el parásito y son principalmente zoofílicas, es decir que tienen hábitos de picadura en animales ⁴⁹.

La hembra para obtener la sangre del huésped humano, corta la epidermis con sus estructuras bucales, punzantes y cortantes, atacando agresivamente en lugares abiertos pero no dentro de las casas, teniendo un patrón de actividad diario según la especie, algunas de ellas prefieren alimentarse principalmente temprano en la mañana y al atardecer, sin embargo pueden atacar a cualquier hora del día ¹⁰.

2.1.6.1 *Simulium exiguum*

Es la principal especie vectora en Ecuador, se encuentra distribuida en la mayoría de provincias tanto al Este y Oeste de la Cordillera de los Andes,

desde los 50 a 2000 mts. sobre el nivel del mar, teniendo una relación potencial de dispersión de la enfermedad con la distribución del vector ⁴³.

La alta competencia vectorial de *S. exiguum* para transmitir la enfermedad medida por el porcentaje de moscas que desarrollan larvas infectantes (56.5%) y el número de larvas por mosca infectada (1 a 50) es comparable solo con las especies de moscas de África ³⁹.

Esta especie se caracteriza por tener una cabeza pequeña con ojos rojos oscuros, antenas café oscuras y piezas bucales de color café naranja. Poseen un tórax arqueado con una giba en la parte superior con colores brillantes como escarcha, un par de alas y tres pares de patas amarillas o café claras ⁴¹.

Los machos son generalmente de color negro y miden aproximadamente de 1.6 a 2.4mm, mientras que la hembra puede ser de mayor tamaño ⁵⁰.

2.1.6.2 *Simulium quadrivittatum*

Es la especie vectora secundaria, se encuentra distribuida en su mayoría en la provincia de Esmeraldas al norte de Ecuador, pero también en países de clima tropical como: Cuba, Panamá, Venezuela, Puerto Rico, Costa Rica, Colombia, México, entre otros ⁴⁴.

Esta especie se caracteriza por tener un cuerpo de color negro, que mide aproximadamente de 2 a 2.7mm. en el caso de las hembras, generalmente los machos son más pequeños en tamaño, su tórax presenta un par de segmentos

que se asemejan a un par de comas de color plata, característica principal de la especie, poseen también un par de alas de una dimensión aproximada de 1.6 a 2.2mm y un par de patas de color café oscuro ⁴⁵.

Poseen una cabeza pequeña, de menor tamaño que la de la especie *S. exiguum* (Observación personal) con ojos rojos, antenas café - naranja y con piezas bucales de color café oscuro ⁴⁵.

2.1.6.3 Ciclo Evolutivo de la mosca

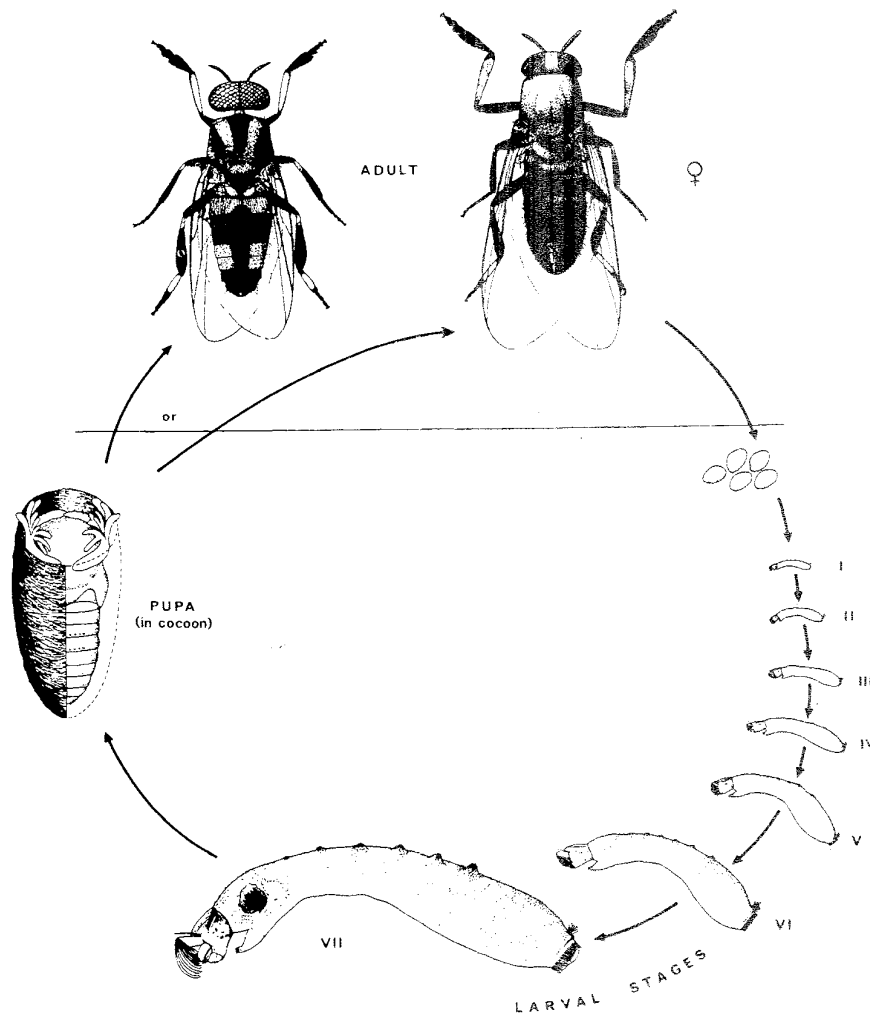


Figura 2.6: Ciclo Evolutivo de la mosca (CROSSKEY, 1990).

El típico hábitat de reproducción de todas las especies de moscas negras son las corrientes de agua bien aireadas. La hembra deposita sus huevos, que miden entre 0.1 y 0.5mm, en cantidades de 300 a 500 justamente en la orilla del agua en vegetaciones como enredaderas. A veces las hembras se ven atraídas por un área particular de la corriente para una oviposición, dando como resultado una gran concentración de larvas en un área muy reducida ¹⁰.

Los huevos fertilizados se incuban en 4-12 horas y las larvas que salen se pegan a las ramas o rocas por medio de una ventosa posterior. La forma del cuerpo es elongada, posee dos pseudópodos o propatas, uno en la mitad ventral y otro en la fase terminal del abdomen, cada propata está armada con una corona compleja formada por numerosas filas de ganchos y poseen un abdomen desnudo, sólo cubierto por vellos ^{3, 23}.

Las larvas se alimentan por medio de un par de abanicos situados en la región cefálica, que mediante su movimiento en el agua atrapan microorganismos y material orgánico para su alimentación. Existen 6 a 8 estadíos larvales que duran entre 7-14 días según la especie y les sirve para ganar tamaño ⁸.

El convertirse en crisálida o pupa toma de a 2 a 6 días, en este estadio se caracteriza por la presencia de los filamentos respiratorios que se proyectan en su parte anterior. Su elongado abdomen tiene nueve segmentos armados con un par de ganchos terminales, su cuerpo en total mide aproximadamente de 2 a 7mm. La mosca adulta emerge a la superficie del agua en una burbuja de aire protector ⁸.

Las hembras son de mayor tamaño que los machos, tienen un abdomen elongado con diez segmentos, tres pares de patas y un par de alas, su cuerpo mide entre 1.2 a 6mm y sus alas de 1.4 a 6mm ^{3,23}.

El ciclo completo de vida de una mosca, por lo tanto, toma de 2 a 3 semanas. Los adultos son fuertes y pueden volar distancias considerables de los sitios de procreación en busca de sangre ⁵.

2.1.7 Estrategias de Control y Eliminación

Existen tres principales medidas de control: la primera es el control vectorial, la segunda es la remoción de los gusanos adultos y la tercera y más importante, la distribución masiva de Ivermectina (Mectizán®) como tratamiento farmacológico ².

2.1.7.1 Control Vectorial

Se trata de la fumigación de las cabeceras de los ríos donde viven las personas afectadas y se encuentran los sitios de criadero de las moscas, atacando los estadíos acuáticos del insecto vector y de esta forma eliminándolo. Esta estrategia fue utilizada exclusivamente en África por la alta prevalencia de la enfermedad y por su alto costo ².

2.1.7.2 Remoción de Gusanos Adultos

Se realiza la extracción mecánica de los nódulos a través de una simple cirugía conocida como nodulectomía, para eliminar al parásito adulto encapsulado

dentro del huésped. En Ecuador se han desarrollado campañas de nodulectomías desde la década de los 80 ².

2.1.7.3 Tratamiento Farmacológico

2.1.7.3.1 Dietilcarbamazina

La más utilizada anteriormente contra las microfilarias, la cual puede producir reacciones alérgicas importantes, a veces graves como: dermatitis, queratitis, linfadenitis, etc. Si hay compromiso ocular, debe tenerse mayores cuidados e iniciar el tratamiento con dosis bajas. Las reacciones alérgicas se controlan con esteroides y antihistamínicos ².

2.1.7.3.2 Amocarcina

Es el más nuevo filaricida que actúa contra microfilarias y parásitos adultos pero este medicamento continúa en experimentación.

Los nódulos deben ser extirpados quirúrgicamente, con el objeto de eliminar los parásitos adultos y disminuir la producción de microfilarias ².

2.1.7.3.3 Suramina

Esta droga es nefrotóxica y por consiguiente está contraindicada en enfermos renales. Produce reacciones alérgicas con frecuencia ².

2.1.7.3.4 Ivermectina (Mectizán®)

Es la droga de elección. Es una lactona macrocíclica semisintética, obtenida por fermentación de caldo de cultivo de *Streptomyces avermilitis*.

El modo de acción no está totalmente aclarado, se sabe que produce parálisis de los helmintos por ser agonista del GABA (ácido gamma-amino-butírico). La acción se hace contra las microfilarias, las cuales prácticamente desaparecen². Las reacciones alérgicas y los problemas oculares por destrucción de microfilarias, son leves, comparadas con las que se observan con dietilcarbamizina. La droga disminuye la producción de microfilarias por los parásitos adultos y cuando se ha administrado adecuadamente se sabe que se destruye entre un 12% y 22% de los parásitos adultos ².



Figura 2.7: Fármaco Ivermectina (Mectizán®) (OEPA, 2000).

2.1.8 Distribución Masiva de Ivermectina (Mectizán®)

Ecuador adoptó como principal estrategia de control la distribución masiva de ivermectina en el año de 1990, en las 119 comunidades endémicas en las provincias de Esmeraldas y Pichincha, donde habitan más de 25.000 personas. El primer año de distribución se realizó en los ríos Santiago y Viche, solamente a aquellas personas positivas por biopsia de piel y en 1991 se inició la administración masiva con intervalos de seis meses para las comunidades hiperendémicas y una vez al año para las comunidades mesoendémicas e hipoendémicas, de acuerdo a la estratificación de las comunidades realizada en 1989. Al momento y con el propósito de alcanzar la eliminación de la enfermedad en el menor tiempo posible, se realizan dos distribuciones al año en todas las comunidades endémicas con coberturas de tratamiento sobre el 85% de la población elegible ².

2.1.8.2 Monitoreo de la Principal Estrategia

Con el propósito de monitorear el impacto de la principal estrategia de control y eliminación de la enfermedad se designaron siete comunidades centinela cuyas características en cuanto al número de habitantes, localización, prevalencia y grupos étnicos, representan a las 119 comunidades endémicas. Las comunidades centinela en el río Santiago son: Playa de Oro, Guayabal y Angostura, las comunidades centinela en el río Cayapas son: El Tigre, Corriente Grande y San Miguel y la comunidad centinela en el río Canandé es: Naranjal ³⁴.

2.1.8.3 Comunidades Centinela

Las comunidades centinela son comunidades hiperendémicas seleccionadas con antelación en las que se efectúan evaluaciones epidemiológicas detenidas a intervalos regulares: primero, antes de comenzar el tratamiento; a continuación, después de dos años y posteriormente, a intervalos de 4 años. Las evaluaciones comprenden indicadores parasitológicos (presencia de microfilarias y nódulos), oftalmológicos (presencia de microfilarias en cámara anterior y queratitis punctata) y entomológicos (tasa de infectividad y de infección parasitaria) ³⁴.

Las comunidades centinela hiperendémicas son aquellas que presentaban en un principio un 60% o más casos de personas portadoras de microfilarias, especialmente importantes para el estudio ³⁴.

Debe señalarse que la utilización del término *comunidades centinela* puede acarrear algunas desventajas. Los miembros de estas comunidades pueden cansarse de los exámenes repetidos y negarse a cooperar, por lo que a través de asambleas a las comunidades se debe informar a la población sobre los beneficios de este tipo de estudios ³⁴.

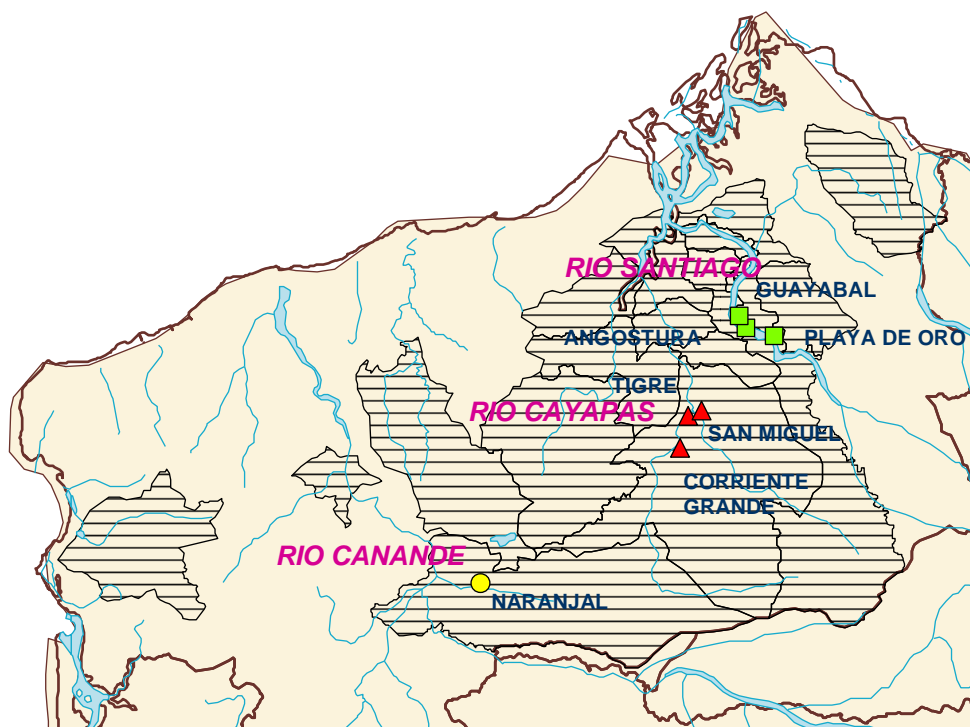


Figura 2.8: Comunidades Centinela del río Cayapas (OEPA, 2003).

2.1.9 Evaluación Epidemiológica a Profundidad (EEP)

La EEP es una encuesta epidemiológica que se lleva a cabo en las comunidades centinela para determinar el impacto del tratamiento con el fármaco Ivermectina (Mectizán®) sobre la prevalencia de infección de oncocercosis. Esta encuesta incluye una evaluación parasitológica, una evaluación oftalmológica y una evaluación entomológica, las cuales se realizan simultáneamente ³⁴.

Se realiza por primera vez antes de iniciar el tratamiento con el fármaco (línea basal), a los dos años y posteriormente, a intervalos de cuatro años ³⁴.

2.1.9.1 Evaluación Parasitológica

Consiste en realizar una biopsia de piel y un examen físico a toda la población de la comunidad centinela y de todos los grupos, incluyendo al grupo de niños de 2 a 5 años, grupo poblacional que no ha recibido tratamiento por no alcanzar los 15 Kg. de peso y que es de gran interés, pues representa el grupo indicador para medir cambios en la dinámica de transmisión ³⁴.

La biopsia permite la identificación de microfilarias en piel para determinar la prevalencia de la infección en las comunidades evaluadas. Se toman dos biopsias en los sitios anatómicos designados por el programa, pues considerando la existencia de diferencias en los hábitos de picadura del vector dependiendo de su ubicación geográfica y la mayor presencia de nódulos palpables, gusanos adultos, localizados en la población huésped. Se sugiere entonces que el sitio para la toma de biopsias sea flexible ³⁴.

El examen físico está orientado a identificar la presencia de lesiones en la piel o través de la palpación la identificación de nódulos ³⁴.

2.1.9.2 Evaluación Oftalmológica

Es un método sencillo y reproducible para determinar el estado de las lesiones oftalmológicas debidas a la oncocercosis el cual se realiza a todas las personas mayores de 10 años de la comunidad centinela. El examen es realizado por un oftalmólogo con adiestramiento en reconocer las lesiones oftalmológicas debidas a oncocercosis que producen ceguera como la queratitis esclerosante, coriorretinitis y atrofia del nervio óptico; también aquellas lesiones que producen morbilidad ocular como queratitis punteada e iridociclitis ³⁴.

Esta evaluación consta de cuatro componentes básicos: la toma de la agudeza visual que puede ser realizada por un técnico, el examen de la pupila, el examen en la lámpara de hendidura y la oftalmoscopia bajo dilatación pupilar³⁴.

2.1.9.3 Evaluación Entomológica

Consiste en realizar capturas de Simúlidos para determinar la presencia de larvas de *O. volvulus* en el vector. Las tasas de infección en moscas son indicadores rápidos y sensibles del cambio en la carga de microfilarias en la comunidad como resultado de la distribución masiva del fármaco Ivermectina (Mectizán®)³⁴.

Las Evaluaciones Entomológicas dentro de las EEP para oncocercosis, nos permite determinar las tasas de infección natural de las principales especies vectoras para monitorear la principal estrategia de control y eliminación de la enfermedad, la distribución masiva del fármaco Ivermectina (Mectizán®)³⁴.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Diseño de la Investigación

El diseño estadístico de esta investigación ha sido clasificado según la información entomológica existente de las tres comunidades evaluadas. Este es un estudio descriptivo de la evaluación del impacto del tratamiento masivo con el fármaco ivermectina (Mectizan®), conocido con el nombre de estudio epidemiológico transversal o llamado también de prevalencia en el que en un momento determinado se mide a la vez, la [prevalencia](#) de la exposición y del efecto en una muestra poblacional, es decir, que se estimó la magnitud y la distribución de la enfermedad dentro de la población vectora.

La comparación de los resultados de esta investigación con los resultados de las anteriores investigaciones en los años 1996 y 2000 se clasifica como un estudio longitudinal ya que se evaluó el impacto del tratamiento masivo con el fármaco, es decir la variable principal, en un grupo determinado mediante los datos obtenidos de análisis reiterados. Este tipo de estudio nos permite determinar la incidencia de la enfermedad y detectar cambios a través del tiempo ya que la muestra se estudia en forma periódica ¹⁵.

3.1.1 Análisis Descriptivo

Se realizó un análisis entre las tasas de infectividad reportadas del año 2000 y las tasas de infectividad del año 2004 resultantes de esta investigación para determinar la reducción de la tasa de infección natural de las principales

especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas ¹². Determinar la reducción de la tasa de infección mediante porcentajes sirve para medir el impacto del programa de intervención.

3.1.2 Análisis Estadístico e Inferencial

Por medio del paquete estadístico epidemiológico EPI info versión 6.04, se realizó un estudio inferencial sobre la infectividad comparando los datos de los años 2000 y 2004 mediante una prueba t de diferencia de proporciones para muestras independientes con la finalidad de aceptar o rechazar la hipótesis planteada, se realizó además un análisis de comparación entre las tasas de infectividad reportadas del año 2000 y las tasas de infectividad del año 2004 resultantes de esta investigación para determinar si la reducción de la tasa de infección natural de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas, fueron estadísticamente significativas ^{11, 33}.

Posteriormente se realizó también un análisis de las tasas de infectividad reportadas del año 1996 (datos basales) y las tasas de infectividad del año 2004 resultantes de esta investigación en las Comunidades de El Tigre y San Miguel.

3.2 Colección del Material Entomológico

3.2.1 Selección de las comunidades para la evaluación

Con el fin de determinar la reducción de la transmisión del parásito *Onchocerca volvulus* por parte de las especies vectoras de simúlidos en el área endémica de oncocercosis, para este estudio se seleccionaron las tres comunidades centinelas que se encuentran en el área del Río Cayapas: El Tigre, San Miguel y Corriente Grande. Estas tres comunidades forman parte de las siete comunidades centinelas en las que el Programa del Ecuador monitorea el impacto de las estrategias de eliminación ⁵³.

3.2.2 Equipos de colectores

Se conformaron dos equipos de colección y cada uno estuvo integrado por un colector y un atrayente, hombres adultos residentes de las comunidades endémicas. Los equipos de colección recibieron tratamiento con ivermectina (Mectizan®) una semana antes de iniciar las capturas. El colector aspiró mediante un aspirador bucal todas las moscas que se posen en la piel expuesta del atrayente antes de que comiencen a picarlo ³⁴.

Las moscas capturadas se colocaron en recipientes de cartón, adecuados para mantenerlas vivas, rotulados con el número correspondiente a la hora y equipo de colección. El atrayente se colocó sentado frente al colector exponiendo las extremidades inferiores, sitio de preferencia de picadura de las especies vectoras ³⁴.

3.2.3 Lugares de captura

Se seleccionaron dos sitios por cada comunidad, uno próximo a las viviendas y

el otro en un lugar cercano a la rivera del río. Las moscas fueron capturadas en los sitios donde las personas pasan la mayor parte de su tiempo y donde los insectos vectores los pican con mayor frecuencia ³⁴.

3.2.4 Cronogramas de capturas

Se realizaron las colecciones de Simúlidos en las tres comunidades evaluadas, en los meses de Junio y Julio que corresponden a la temporada de máxima transmisión. Con el fin de capturar las 10.000 moscas por cada comunidad se programaron 8 días de capturas continuas ³⁴.

Se efectuaron diez horas de captura durante todo el horario diurno, entre las 07:00 y las 12:00 horas en la mañana y entre las 13:00 y las 18:00 horas en la tarde, con una interrupción de una hora a mediodía. Cada hora de captura de cada equipo se dividió en 50 minutos, seguidos de 10 minutos de descanso ³⁴.

Cada unidad de captura obtenida en los periodos de 50 minutos fueron conservadas en etanol al 99.9% con la identificación de la comunidad, el horario de captura y el equipo de colectores ³⁴.

3.3 Identificación de Especies y Agrupamiento en Pools

En el laboratorio se examinaron bajo un estereomicroscopio, las moscas de cada unidad de captura y se identificó la especie utilizando la clave taxonómica de Simúlidos en el Ecuador, además se separaron aquellas moscas que habían ingerido sangre e insectos dípteros pertenecientes a otras familias. Las moscas se cuentan luego en lotes o grupos “pools” de 50 cada uno, por especies y se las coloca en tubos de tapa rosca que contienen etanol al 99.9% ³⁴.

3.4 Procesamiento de Muestras

3.4.1 Separación de Cabezas y Cuerpos

Se siguió el Protocolo Completo para el Análisis de O-150 PCR en moscas negras infectadas con *O. volvulus*, según Unnasch, 2005⁴⁸. Cada uno de los pools de moscas fueron enjuagados en etanol y colocados sobre un recipiente plástico o sobre un papel filtro absorbente, con el fin de dejar que el etanol se evapore hasta que parezcan estar secas. No se permitió que las moscas se dessequen completamente, ya que esto interviene en la purificación de la muestra durante el procesamiento.

Se colocaron 6 tubos tapa rosca con 50 moscas cada uno, en una botella de plástico (tubos Falcon) de 25ml. Se colocaron los tubos a -70°C en la fase gaseosa del nitrógeno líquido durante 30 minutos.

Se separaron las cabezas de los cuerpos de las moscas golpeando los tubos vigorosamente sobre una superficie acolchonada. Se usó una máscara protectora facial y anteojos resistentes durante este proceso.

Cada uno de los pools de moscas fueron resuspendidos en etanol al 99.9% y se vertió la mezcla de etanol y moscas a través de un tamizador de 0.25mm a una caja petri. Los cuerpos se colectaron en el tamizador y las cabezas pasaron a la caja petri. Se enjuagó el tamizador repetidas veces con el fin de asegurar el paso de todas las cabezas.

Las cabezas y cuerpos por separado fueron colocados en tubos tapa rosca de 2.0ml con etanol al 99.9%.

3.4.2 Maceración de Cabezas y Cuerpos

Se retiró todo el etanol de cada uno de los tubos empleando una pipeta pasteur de punta fina, permitiendo que el etanol se evapore a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Luego se adicionó 300µl del buffer de homogenización que contenía la solución acarreadora de ADN. Se maceró con un homogenizador de plástico resistente hasta que las moscas estén completamente desechas y la solución total se torne de un color café oscuro.

3.5 Extracción de ADN

Al macerado, se adicionó 100µl de la solución de proteinasa K y se incubó el extracto a 55° C. durante una hora. Se adicionó 4µl de DTT 1M y se dejó hervir a baño maría durante 30 minutos. Se utilizó tubos con tapa rosca para evitar perder material ya que con la temperatura y la presión los tubos podrían abrirse.

Se congeló y descongeló el extracto durante dos veces, para causar un choque térmico y permitir que las proteínas de las moscas que se encuentren en la solución se desnaturalicen y no interfieran en la extracción del parásito.

Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf de 2.0ml para extraer el homogenizado con 400µl de una mezcla 1/1 de fenol y cloroformo, transfiriendo la capa superior a un segundo tubo y realizar otra extracción con fenol/cloroformo. Se extrajo una vez la capa acuosa de la segunda extracción fenólica empleando 400µl de cloroformo, permitiendo una limpieza mayor del ADN.

Al volumen de la capa acuosa se adicionó 3 volúmenes de la solución de Nal y incubó a 4°C. por 15 minutos.

Se colocó una placa de 96 pocillos sobre la bomba de extracción y se adicionó cuidadosamente la solución anterior en cada pocillo correspondiente, colocando primero la mitad del volumen aproximadamente unos 500 μ l y posteriormente toda la solución. Se prendió la bomba al vacío y se esperó que toda la solución pase a través de los pocillos, permitiendo de esta manera que el ADN se adhiera en el filtro de la placa.

Se añadió a cada pocillo 500 μ l de solución de lavado con etanol, mediante la bomba al vacío se esperó de igual manera que todo la solución pase, repitiendo este paso por dos ocasiones, para que el ADN obtenido este lo suficientemente limpio.

A la placa añadimos 50 μ l de agua destilada y autoclavada, colocando el filtro de la placa y tapándolo con un papel parafilm de 15 a 20 minutos para evitar cualquier contaminación. Concluido el tiempo de espera se centrifugó la unidad a 2500 RPM durante 5 minutos y se añadió 150 μ l de la solución de Nal a cada pocillo para incubarlo a 4°C. por 15 minutos. Repetimos todo el proceso una vez más para obtener la extracción de un ADN más puro, entonces se colocó el producto de la centrifuga nuevamente en la placa de 96 pocillos.

Para finalizar se disolvió nuevamente el ADN de la placa con 50 μ l de agua destilada como se describió anteriormente y se guardó el producto a temperaturas de - 20°C para su conservación.

3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del ADN en cada reacción se utilizó 47.5 μl de master mix (Tabla 3.1) más 2.5 μl de muestra de ADN, hasta completar un total de 50 μl en cada tubo.

Se preparó así entonces, una solución total de aproximadamente 5000 μl y se distribuyó las alícuotas de dicha solución en las placas para PCR de 96 pocillos dentro del área de preparación del Master Mix conocida como área blanca, la cual estuvo totalmente libre de contaminación y alejada del área del termociclador para la amplificación del ADN. En esta área también se colocó los controles negativos de la placa, agua destilada purificada.

Se transportó la placa del área blanca al área de amplificación conocida como área oscura, la que estuvo protegida de la luz solar para no permitir la degradación del ADN. Se colocó el ADN de las muestras extraídas y los controles positivos de la placa.

En cada pocillo de la placa se colocó una gota de aceite mineral y se la cubrió con un papel sellador estéril para evitar perder muestra en el termociclador por la presión de los cambios de temperatura. Finalmente se rotuló la placa y se la colocó en el termociclador previamente programado (Tabla 3.2).

Tabla 3.1: Proceso de PCR. Preparación del Master Mix.

| PREPARACION DEL MASTER MIX | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------|
| Reactivo | Una Reacción | Cien Reacciones |
| Agua de PCR | 3,4 µl | 3400 µl |
| 10x Buffer | 5,0 µl | 500 µl |
| 2 mM dNTP's | 5,0 µl | 500 µl |
| 20 uM 1632 primer | 1,25 µl | 125 µl |
| 20 uM 1633 biotin primer | 1,25 µl | 125 µl |
| Taq DNA polymerasa | 1,0 µl | 100 µl |
| VOLUMEN TOTAL | 47,50 µl | 4750 µl |
| ADN de las muestras | 2,5 µl | 250 µl |
| VOLUMEN APROX. | 50,0 µl | 5000 µl |

Las secuencias de los primers que se han utilizado son (Unnasch, 2005).

Primer 1632: 5' GATTYTTCCGRCGAANARCGC 3'

Primer 1633 biotin: 5' biotin – GCNRTRTAAATNTGNAAATTC 3'

N= A, G C o T

Y= C o T

R= A o G

Tabla 3.2: Proceso de PCR. Programación en el Termociclador ³².

| AMPLIFICACION EN EL TERMOCICLADOR | | | |
|--|---------------|--------------------|---------------|
| Paso | Tiempo | Temperatura | CICLOS |
| Denaturación | 1 minuto | 94° C. | 5 |
| Apareamiento | 2 minutos | 37° C. | |
| Extensión | 30 segundos | 72° C. | |
| Denaturación | 30 segundos | 94° C. | 35 |
| Apareamiento | 30 segundos | 37° C. | |
| Extensión | 30 segundos | 72° C. | |
| Extensión Final | 6 minutos | 72° C. | 0 |
| Conservación | ----- | 4° C. | |

3.7 Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

En cada placa de ELISA, se colocaron los dos controles positivos amplificados en el PCR en los pocillos A11 Y A12 y diez reacciones de controles negativos productos del PCR en los pocillos A1 a A10 de la placa. Se dispuso de 84 pocillos adicionales para realizar la reacción de ELISA de las muestras de ADN ²⁴.

Primero, se cubrió la placa con 100µl de la solución de estreptavidina diluida en el buffer de cubierta, por un mínimo de 2 horas a 37° C., mientras se incubó la placa se removió el buffer de hibridación mantenido a 4°C. y se colocó a 37° C. a baño maría para disolverlo. Se preparó suficiente TBS/Tween para lavar la placa (aproximadamente dos litros por placa) y que el sustrato y el amplificador del Sistema de Amplificación de ELISA (INVITROGEN, Cat. No. 19589-019, USA) estuvieran diluidos a temperatura ambiente. Se colocó también el buffer SSPE/SDS a 42° C.

Se lavó la placa 6 veces con TBS/Tween, para luego vaciarla y sacudirla completamente sobre un papel toalla en cada lavada. Se usó una piceta para cargar al TBS/Tween. Se adicionó 20µl de buffer de hibridación (HB) a cada pocillo, luego se añadió 5µl del producto de PCR no diluido (10% de la reacción) en el correspondiente pocillo, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Durante el mismo tiempo se diluyó el ADN (OVS2-FL) a 50 ng/ml en HB.

Se lavó la placa 6 veces con TBS/Tween, se adicionó 100µl 1N NaOH a cada pocillo, para luego incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.

Se lavó la placa 6 veces con TBS/Tween, se adicionó 50µl de la prueba OVS2-FL diluida a 50 ng/ml en HB a cada pocillo, se incubó por 15 minutos a 42° C.

Nuevamente se lavó la placa 6 veces con TBS/Tween, se adicionó 100µl del buffer SSPE/SDS precalentado en cada pocillo, se incubó 10 minutos a 42° C., en este tiempo se removió los reactivos de amplificación del congelador si la dilución del reactivo fue necesaria y se los mantuvo a temperatura ambiente. Se preparó el conjugado (anti fragmentos Fab floureceina) diluyéndolo a 1/10.000 en buffer de dilución de anticuerpos (1µl de fragmentos Fab más 10ml del buffer de dilución).

Se lavó la placa 6 veces con TBS/Tween y se adicionó 50µl del fragmento antifluoreceina en cada pocillo, incubándolo por 15 minutos a 37° C.

Se lavó la placa 6 veces con TBS/Tween, se adicionó 25µl del sustrato a cada pocillo, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió 25µl del amplificador a cada pocillo y se observó como la placa desarrolló un color rosado. Se esperó de 5 a 15 minutos para el proceso de reacción.

Finalmente a los 15 minutos se adicionó 25µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.3M en cada pocillo para detener la reacción y se realizó la lectura de la placa en el lector especial Whittaker de ELISA (espectrofotómetro) a 492 nm.

3.7.1 Determinación del punto de corte “cut off”

Para el análisis de resultados obtenidos después del procesamiento con la técnica de ELISA se tomó la media de los diez controles negativos que se utilizaron según el protocolo y se determinó la desviación estándar de ellos,

adicionando además un valor igual a tres desviaciones estándar de la media de los controles negativos. Este valor se lo utilizó como punto de corte, conocido como “cut off” para el ensayo, en donde si el valor de la absorbancia de la muestra fue mayor al punto de corte, la muestra fue positiva y si el valor fue menor la muestra se la consideró negativa.

3.8 Tasas de Infectividad

Por medio del programa Poolscreen™ versión 2.0, se determinaron las Tasas de Infectividad de las tres comunidades en estudio expresadas con intervalos de confianza del 95% ^{25, 12}.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Población vectorial analizada

El número total de moscas colectadas en las tres comunidades centinela del río Cayapas fue de 66.342, todas pertenecientes al género *Simulium*. Las moscas aptas para el procesamiento de PCR-ELISA, es decir los Simúlidos sin sangre fueron 35.351, o sea 706 grupos o “pools” (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Número de “pools” y moscas colectadas de las tres comunidades centinela del río Cayapas.

| COMUNIDADES CENTINELA | Simúlidos colectados | Simúlidos con sangre | Simúlidos sin sangre | Número de Pools |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| Corriente Grande | 28578 | 15862 | 12716 | 254 |
| San Miguel | 19069 | 6537 | 12532 | 250 |
| El Tigre | 18695 | 8592 | 10103 | 202 |
| | 66342 | 30991 | 35351 | 706 |

4.2 PCR-ELISA

En la comunidad de El Tigre, se analizaron 168 pools de cuerpos de los cuales cuatro tuvieron valores que superaron el valor del “cut off” calculado en cada una de las placas realizadas, es decir fueron positivos.

Habiendo encontrado positividad en los cuerpos analizados se comenzó el procesamiento de los 202 pools de cabezas encontrándose seis pools positivos (Tabla 4.2; Anexo A).

Tabla 4.2: Lecturas de las absorbancias positivas en el procesamiento de PCR-ELISA en la Comunidad de EL Tigre.

| EL TIGRE | | | | |
|----------|---------|------------------|-------------|-----------------|
| Placas # | Cut off | Pocillo Positivo | Absorbancia | Tipo de Muestra |
| 1 | 0,232 | ----- | ----- | ----- |
| 2 | 0,244 | D1 | 0,299 | Cuerpo |
| 2 | 0,244 | F1 | 0,274 | Cuerpo |
| 2 | 0,244 | F3 | 0,355 | Cuerpo |
| 2 | 0,244 | H11 | 0,267 | Cuerpo |
| 3 | 0,299 | F10 | 0,397 | Cabeza |
| 3 | 0,299 | G1 | 0,351 | Cabeza |
| 4 | 0,293 | B12 | 0,364 | Cabeza |
| 4 | 0,293 | C11 | 0,348 | Cabeza |
| 4 | 0,293 | G1 | 0,353 | Cabeza |
| 5 | 0,308 | D10 | 0,364 | Cabeza |

De los 134 pools de cuerpos analizados en la comunidad de Corriente Grande, cuatro pools resultaron positivos al superar el valor del “cut off” calculado. No se encontraron pools de cabezas positivas (Tabla 4.3; Anexo A).

Tabla 4.3: Lecturas de las absorbancias positivas en el procesamiento de PCR-ELISA en la Comunidad de Corriente Grande.

| CORRIENTE GRANDE | | | | |
|------------------|---------|------------------|-------------|-----------------|
| Placas # | Cut off | Pocillo Positivo | Absorbancia | Tipo de Muestra |
| 6 | 0,207 | B8 | 0,219 | Cuerpo |
| 6 | 0,207 | B12 | 0,357 | Cuerpo |
| 6 | 0,207 | D11 | 0,212 | Cuerpo |
| 6 | 0,207 | F11 | 0,218 | Cuerpo |
| 7 | 0,222 | ----- | ----- | ----- |
| 8 | 0,254 | ----- | ----- | ----- |
| 9 | 0,225 | ----- | ----- | ----- |
| 10 | 0,208 | ----- | ----- | ----- |

Dos pools de cuerpos de un total de 166 analizados en la comunidad de San Miguel resultaron positivos, por lo que se procedió a analizar los 250 pools de cabezas, obteniéndose una sola muestra superior al valor del punto de corte calculada para esa placa, es decir una muestra positiva (Tabla 4.4; Anexo A).

Tabla 4.4: Lecturas de las absorbancias positivas en el procesamiento de PCR-ELISA en la Comunidad de San Miguel.

| SAN MIGUEL | | | | |
|------------|---------|------------------|-------------|------------------|
| Placas # | Cut off | Pocillo Positivo | Absorbancia | Tipo de Muestras |
| 11 | 0,290 | G11 | 0,374 | Cuerpo |
| 11 | 0,290 | H12 | 0,310 | Cuerpo |
| 12 | 0,179 | ----- | ----- | ----- |
| 13 | 0,206 | ----- | ----- | ----- |
| 14 | 0,166 | C2 | 0,153 | Cabeza |

4.3 Tasas de Infectividad

Los seis pools positivos encontrados en la Comunidad de El Tigre representan una Tasa de Infectividad de 6,02. La Tasa de Infectividad en la Comunidad de San Miguel fue de 0,8, al encontrarse un solo pool positivo y La Comunidad de Corriente Grande presentó negatividad en los 254 pools de moscas analizados (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Tasas de Infectividad de las Comunidades Centinela del río Cayapas.

| COMUNIDADES CENTINELA | Número de Simúlidos analizados | Número de Pools de Simúlidos analizados | Número de Pools de Cabezas Positivas | TI Intervalos de Confianza del 95% |
|-----------------------|--------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------------------|
| El Tigre | 10103 | 202 | 6 | 6,02 (2,05 – 13,3) |
| Corriente Grande | 12716 | 254 | 0 | 0,0 |
| San Miguel | 12532 | 250 | 1 | 0,8 (0,02 – 4,1) |
| | 35351 | 706 | 7 | |

4.4 Análisis Descriptivo

En el estudio de evaluación realizado en el año 2000 en la Comunidad de El Tigre, se analizaron 340 pools de moscas obteniéndose un TI de 9,0. En comparación al año 2004, en el que se analizaron 202 pools obteniéndose un TI de 6,02, existió una reducción del 33,11%. La Comunidad de San Miguel tuvo un % de reducción entre los años 2000 y 2004 del 27,27% y no encontrándose positividad en la Comunidad de Corriente Grande el porcentaje de reducción fue del 100% (Tabla 4.6).

Tabla 4.6: Diferencia y Porcentaje de Reducción entre las Tasas de Infectividad del año 2000 y 2004.

| | 2000 | 2004 | Análisis Descriptivo |
|--|------|------|----------------------|
|--|------|------|----------------------|

| COMUNIDADES CENTINELA | Número de Simúlidos analizados | TI/ Intervalos de Confianza del 95% | Número de Simúlidos analizados | TI/ Intervalos de Confianza del 95% | Diferencia de Tasas | % de Reducción |
|-----------------------|--------------------------------|--|--------------------------------|--|---------------------|----------------|
| El Tigre | 17000 | 9,0 (4,5 - 16,1) | 10103 | 6,02 (2,05 - 13,3) | 2,98 | 33,11 |
| Corriente Grande | 23500 | 2,1 (0,7 - 5,0) | 12716 | 0,0 | 2,1 | 100 |
| San Miguel | 9600 | 1,1 (0,03 - 6,4) | 12532 | 0,8 (0,02 - 4,1) | 0,3 | 27,27 |

4.5 Análisis Estadístico e Inferencial

Después de realizar un análisis inferencial para aceptar o rechazar la hipótesis planteada en este trabajo de investigación, la diferencia de proporciones de muestras independientes rechaza la hipótesis de que si se produjo una reducción en las tasas de infectividad de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, luego de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las tres comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas, determinadas mediante la técnica PCR-ELISA (Tabla 4.7).

Haciendo un análisis estadístico de las tasas de Infectividad de las tres comunidades centinela entre los años 2000 y 2004, las proporciones independientes presentaron resultados que no son estadísticamente significativos (Tabla 4.7).

Tabla 4.7: Análisis Inferencial y Comparación de las Proporciones Independientes entre las Tasas de Infectividad del año 2000 y 2004.

| | 2000 | 2004 | Análisis Inferencial | Análisis Estadístico |
|--|------|------|----------------------|----------------------|
| | | | | |

| COMUNIDADES CENTINELA | Número de Simúlidos analizados | TI Intervalos de Confianza del 95% | Número de Simúlidos analizados | TI Intervalos de Confianza del 95% | Valor de t | Valor de p |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------|------------|
| El Tigre | 17000 | 9,0 (4,5 - 16,1) | 10103 | 6,02 (2,05 - 13,3) | 0.769432 | 0.438406* |
| Corriente Grande | 23500 | 2,1 (0,7 - 5,0) | 12716 | 0,0 | NC | NC |
| San Miguel | 9600 | 1,1 (0,03 - 6,4) | 12532 | 0,8 (0,02 - 4,1) | 0.217653 | 0.494787* |

* p= Ns

La comparación de la Tasa de Infección entre los datos basales, pre-tratamiento con el fármaco del año 1996 y los datos post-tratamiento obtenidos en el presente estudio del año 2004, en las dos comunidades, El Tigre y San Miguel presentaron resultados altamente significativos (Tabla 4.8).

Tabla 4.8: Comparación entre las Tasas de Infección del año 1996 y 2004 de las comunidades centinela de El Tigre y San Miguel.

| COMUNIDADES CENTINELA | 1996 | | 2004 | | Análisis Estadístico |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| | Número de Simúlidos analizados | TI Intervalos de Confianza del 95% | Número de Simúlidos analizados | TI Intervalos de Confianza del 95% | Valor de p |
| El Tigre | 2550 | 72,7 (42 - 116) | 10103 | 6,02 (2,05 - 13,3) | 0.000000 |
| San Miguel | 3150 | 65,0 (39 - 101) | 12532 | 0,8 (0,02 - 4,1) | 0.000000 |

4.6 Discusión

Por medio de este estudio se comprueba que la distribución masiva de

ivermectina (Mectizan®) en forma semestral en todas las comunidades endémicas y coberturas de tratamiento mayores al 85% han constituido hasta ahora la principal estrategia para alcanzar la eliminación de la enfermedad en las Américas. Los países de la región tienen como meta alcanzar la eliminación de la morbilidad ocular para el año 2007 y alcanzar la interrupción de la transmisión en los focos donde sea posible. Sin embargo, al obtener datos de p estadísticamente no significativa de reducción en las tasas de infectividad entre los años 2000 y 2004 (Tabla 4.7), los resultados de esta investigación brindan la certeza de que para el futuro tal vez se debería determinar una nueva y moderna estrategia de control y eliminación ya que hasta la actualidad existe una reducción paulatina de la transmisión de la enfermedad a través de los años que si es bien dirigida permitirá alcanzar su eliminación de las áreas endémicas localizadas en el país.

Para que se establezca la enfermedad es necesaria la existencia de múltiples picaduras infectantes a través de los años en la población que habita en las zonas endémicas cerca de ríos correntosos que permiten la reproducción del vector transmisor del parásito. Es importante para los programas de control y eliminación el realizar estudios de impacto de las estrategias sobre la población huésped como en la población vector. Es por esto que la presente investigación al igual que muchas otras se centra en el análisis del díptero transmisor principalmente, una reducción dramática de las tasas de infectividad en los primeros años de tratamiento ha permitido que los estudios posteriores obtengan datos de reducciones parciales o reducciones nulas pero que aportan valiosa información para el seguimiento de la transmisión de la

enfermedad en el Ecuador.

Las Evaluaciones Entomológicas constituyen un medio de monitoreo del impacto del tratamiento masivo con ivermectina en toda el área endémica de oncocercosis en el Ecuador, sobre el proceso de transmisión del parásito a través del vector. Quizás, la medida de los niveles de transmisión es el más importante y directo método de evaluación del progreso de un programa de control, con el fin de evaluar las estrategias implementadas y constituye el indicador final que permita determinar la interrupción de la transmisión, es decir la eliminación de la enfermedad.

La determinación de las tasas de infectividad en las moscas del género *Simulium* pueden ser relacionadas con el efecto de la distribución masiva de ivermectina (Mectizan®) en forma ininterrumpida y las coberturas de tratamiento alcanzadas en las comunidades centinela del foco endémico en la Provincia de Esmeraldas, permite analizar los criterios de reducción de las tasas de infectividad y una posible interrupción de la transmisión. Es por tanto que los TI calculados por comunidades a través de los años son indicadores necesarios que se deben analizar para determinar como la población vectora ha ido evolucionando con la enfermedad y el tratamiento. Los resultados de esta investigación comparados con los del año 2000, $p > 0.05$, demuestran que en el foco endémico principal del río Cayapas no existe una reducción significativa, ya que se cree que en la actualidad prevalece una muy pequeña cantidad de vectores infectados que permiten que el proceso de transmisión disminuya muy lentamente. Además es posible que el fármaco que se utiliza

como tratamiento principal ya no cause el mismo efecto en la población tratada y hasta puede que crea una resistencia al parásito por tantos años de intervención.

El método de análisis PCR-ELISA es una herramienta biotecnológica útil para determinar la prevalencia de infectividad de los vectores de esta enfermedad y comparar los resultados con estudios de evaluaciones anteriores, permitiendo un monitoreo eficiente y determinando la reducción en las tasas de infección natural producto de la implementación de las estrategias.

En comparación con otras investigaciones se ha determinado que un PCR con visualización en placas de ELISA es alrededor de 100 veces más sensible que un PCR con visualización en gel, prácticamente todas las muestras positivas pueden ser visualizadas. El ensayo PCR-ELISA es doblemente específico porque además utiliza una prueba fluorescente para *O. volvulus*. La aplicación de esta técnica en este proyecto al igual que en muchos otros estudios fue sumamente confiable y brindó muy buenos resultados.

Conclusiones

Con el presente trabajo de investigación, se rechaza la hipótesis de que la tasa de infección natural de las principales especies vectoras de *Onchocerca volvulus*, presenta una reducción, como resultado de la distribución masiva de Ivermectina (Mectizan®) en las tres comunidades centinela del foco endémico principal del río Cayapas en la Provincia de Esmeraldas, determinadas mediante la técnica PCR-ELISA, entre los años 2000 y 2004. Los análisis estadísticos realizados con niveles de significación de 0.05, con 95% de confianza y valores de p calculados sobre el rango permitido bajo cada una de las colas en la curva de la distribución normal permiten que se crea que la hipótesis planteada es falsa.

La Comunidad de El Tigre presentó seis pools de cabezas positivos de un total de 202 pools analizados. La prevalencia de infectividad de este grupo calculado por medio del programa PoolScreen versión 2.0 estima que 6 moscas de un total de 10.000 analizadas pueden ser infectivas y transmitir el parásito *O. volvulus*.

A pesar de que la tasa de infectividad presenta un porcentaje de reducción numérica pero no estadística en comparación con los datos del año 2000. Los resultados no son estadísticamente significativos para toda la población al obtener en este análisis un valor de p superior a 0,05 del rango del error muestral con intervalos de confianza del 95%. A diferencia de la comparación con los datos del año 1996, los resultados son altamente significativos ya que se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$ pues hay mucho tiempo de intervención lo que

demuestra que el fármaco logra una baja significativa pero que en este momento ya no es eficiente como estrategia para terminar con el foco endémico principal.

La Comunidad de San Miguel presentó únicamente un pool de cabezas positivo de un total de 250 pools analizados. La prevalencia de infectividad en las moscas vectoras es menor de una (0,8) en 10.000, que puede ser infectiva para el parásito *Onchocerca volvulus*, resultado no estadísticamente significativo por estar debajo del rango del error muestral 0,05. Sin embargo, la comparación con la tasa de infectividad pre-tratamiento del año 1996 los resultados son altamente significativos.

En la Comunidad de Corriente Grande todos los pools de cabezas fueron negativos de un total de 254 pools analizados. La prevalencia de infectividad de este grupo calculado estima que ninguna mosca de un total de 10.000 puede ser infectiva y transmitir el parásito *O. volvulus*, lo que nos permite pensar que la interrupción de la transmisión posiblemente ha sido alcanzada, los resultados demuestran no ser estadísticamente significativos. Para esta comunidad no existen estudios de evaluación pre-tratamiento, por lo que no se pudo realizar la comparación.

Los resultados de esta investigación revelan un dramático efecto de la distribución del fármaco Ivermectina (Mectizan®) sobre el proceso de transmisión de la enfermedad. Las Rondas de Tratamiento (Anexo B) demuestran el éxito de los porcentajes de coberturas en las tres comunidades

centinela del Río Cayapas. Sin embargo, el menor número de años y rondas recibidas por la población de las comunidades de El Tigre y San Miguel, de alguna manera explican el no haber alcanzado la interrupción de la transmisión del parásito por parte del vector en esta área. Los 13 años con 21 rondas de tratamiento continuos en la comunidad de Corriente Grande hasta el momento de la evaluación, determinan el haber encontrado una tasa de infectividad de cero, que permite asumir la interrupción de la transmisión en esta comunidad.

Los datos encontrados en este estudio confirman los resultados de las evaluaciones anteriores que demuestran que múltiples tratamientos con Ivermectina (Mectizan®) reducen gradualmente la transmisión del parásito *O. volvulus*, pero se cree que la principal estrategia de control, la distribución masiva con el fármaco, tal vez no tiene la misma eficacia después de tantos años, se puede confirmar la gran capacidad vectorial de las principales especies transmisoras y el alto grado de contacto huésped-vector en esta área. Por lo que realizar también estudios de resistencia del parásito al medicamento sería otra hipótesis interesante de investigar.

PCR-ELISA es un excelente método de diagnóstico de *O. volvulus* en la población vectorial ya que el análisis de las moscas vectoras es una estrategia de control importante, además, con esta técnica se puede analizar una mayor cantidad de muestras en un tiempo de procesamiento más corto que un PCR con visualización en geles de agarosa, también brinda mayor seguridad al investigador arrojando resultados confiables.

El presente estudio demuestra que la técnica PCR-ELISA puede ser exitosamente desarrollada en laboratorios de países endémicos para oncocercosis que tienen una infraestructura adecuada y la capacidad técnica para su realización.

Es importante que los laboratorios que desarrollan técnicas de biología molecular tengan el soporte de laboratorios de referencia a nivel internacional para el asesoramiento en la realización de dichas técnicas y su control de calidad. Las personas involucradas en este estudio recibieron capacitación y adiestramiento en la estandarización de la técnica PCR-ELISA por parte del laboratorio certificado para el procesamiento de moscas negras del género *Simulium* de la Universidad de Alabama en Birmingham.

Recomendaciones

La alta especificidad y sensibilidad demostrada por la técnica molecular PCR-ELISA analizado en este proyecto de investigación, nos permite recomendar su utilización como estrategia de control para una siguiente evaluación de los indicadores entomológicos en el proceso de eliminación de la transmisión de oncocercosis.

En cada uno de los procesos de la prueba PCR-ELISA como en cualquier prueba molecular es muy importante realizar cada paso con mucha precaución. Con un adecuado y cuidadoso tratamiento de las muestras y la repetición de un ensayo al azar se puede realizar un control de calidad eficiente de la prueba.

Con el paso del tiempo la utilización de técnicas moleculares ha ido en incremento, ahora estas técnicas son de uso rutinario, es recomendable contar con el asesoramiento de laboratorios serios y profesionales capacitados que den una correcta guía con el fin de direccionar adecuadamente un proyecto de investigación y poder brindar un servicio comunitario que beneficie a las comunidades en estudio.

Se recomienda realizar continuamente los análisis de investigación (EEP) Evaluaciones Epidemiológicas a Profundidad, en parasitología, oftalmología y entomología para una mejor evaluación del impacto de la distribución del fármaco en la reducción de la prevalencia de la enfermedad.

El Programa Nacional de oncocercosis debería investigar las causas certeras de la falta de reducción de las tasas de infectividad reportadas en esta investigación con el fin de alcanzar en el menor tiempo posible la certificación de eliminación de la enfermedad.

Listado de Referencias

- ¹ BLANKS, J., RICHARDS, F., BELTRAN, F., COLLINS, R., ALVAREZ, E., ZEA FLORES, G., BAULER, B., CEDILLOS, R., HEISLER, M., BRANDLING-BENNETT, D., BALDWIN, W., BAYONA, M., KLEIN, R., JACOX, M. (1998). The Onchocerciasis Elimination Program for the Americas: A History of Partners-hip. *Rev. Panam Salud Pública.* 3: 367-375.
- ² BOTERO, D., RESTREPO, M. (1992). Parasitosis humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas. Segunda Edición. Impreso en Medellín, Colombia. pp. 274-279.
- ³ BÖTTGER, K. (1977). The general life cycle of fresh water mites. *Acarología.* 18: 496-502.
- ⁴ CARVAJAL, H., L., ZEREGA, F. (1980). La Oncocercosis en Ecuador. Primer caso demostrado, *Revista Ecuatoriana de Higiene y Medicina Tropical,* 33:1-12.
- ⁵ CASTALDI, M., GUTIERREZ, O. (1981). Contribución al estudio de la bioecología de los simúlidos (Díptera, *Simuliidae*) transmisores de oncocercosis: entomofauna asociada a las formas larvianas. *Folia Entomológica Mexicana.* 50: 97-107.
- ⁶ COLLINS, R., LEHMANN, T., VIEIRA, J. C., GUDERIAN R.H. (1993). Vector Competence of *Simulium exiguum* for *Onchocerca volvulus*: Implications for the Epidemiology of Onchocerciasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 52: 213-218.
- ⁷ CROSSKEY, R. (1990). The Natural History of Blackflies. Publicado por Wiley, J., & Sons, England. Other Wiley Editorial Offices. pp. 2-48.
- ⁸ CUPP, E., GORDON, A. (1983). Notes on the systematics, distribution and bionomics of black flies (Díptera, *Simuliidae*) in the northeastern United States. *Search: Agriculture.* 25: 1-74.
- ⁹ DALMAT, H. (1952). Longevity and further flight range studies on the blackflies (Díptera, *Simuliidae*), with the use of aniline dyemarkers. *Annals of the Entomological Society of America.* 45: 23-37.
- ¹⁰ DAVIES, L., ROBERTS, D. (1980). Flight activity of female blackflies (Díptera, *Simuliidae*) studied with a vehicle-mounted net in northern England. *Journal of Nature History.* 14: 1-16.

- ¹¹ DAWSON – SAUNDERS, B., TRAPP, R. (1993). Bioestadística Médica. Traducido por Q.F.B. Ma. del Rosario Carsolio Pacheco. Editorial El Manual Moderno. Impreso en México. pp. 166-172.
- ¹² DEVER, A. (1991). Epidemiología y Administración de Servicios de Salud. Organización Panamericana y Mundial de la Salud. Aspen Publishers. Impreso en Estados Unidos. pp. 76-116.
- ¹³ ERLICH, A. (1992). Genetic analysis using the polymerase chain reaction *Annual Review Genet.* 26: 479-506.
- ¹⁴ ERLICH, A. (1992). Polymerase Chain Reaction strategy *Annual Review Genet.* 61: 131-156.
- ¹⁵ FISHER, A., LAING, J., STOECKEL, J., TOWNSEND, J. (1991). Manual para el Diseño de Investigación Operativa en Planificación Familiar. The Population Council. Segunda Edición. Impreso en México pp. 40-52.
- ¹⁶ GELFAND, INNIS. (1993). Optimization of PCRs. In PCR protocols. pp. 3-12.
- ¹⁷ GUDERIAN, R.H., ANSELMINI, M., ESPINEL, M., MANCERO, T., RIVADENEIRA, G., PROAÑO, R., CALVOPÍÑA, H.M., VIEIRA, J.C., COOPER, P. (1997). Successful control of onchocerciasis with community-based ivermectin distribution in the Rio Santiago focus in Ecuador. *Tropical Medicine and International Health* 2: 982-988.
- ¹⁸ GUDERIAN, R.H., LEON, L., A., LEON, R., CORRAL, F., VASCONEZ, C., JOHNSTON, T.S. (1982). Report on a focus of onchocerciasis in Esmeraldas province of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 31: 270-274.
- ¹⁹ GUDERIAN, R.H., SHELLY, A.J. (1992). Onchocerciasis in Ecuador: The Situation in 1989. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 87: 405 -415.
- ²⁰ GUDERIAN, R.H., SWANSON, D., CARRILLO, D., R., PROAÑO, S., R., MOLEA, J., SWANSON, W.,L. (1983). La oncocercosis en Ecuador II. Epidemiología de los focos endémicos de la provincia de Esmeraldas. FCM. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas 8: 131-143.

- ²¹ GUEVARA, A. G., VIEIRA, J. C., BRUCE, G., LOPEZ, A., VIEIRA, N., RUMBEA, J., COLLINS, R., KATHOLI, C.R., UNNASCH, T.R. (2003). Entomological Evaluation by Pool Screen Polymerase Chain Reaction of *Onchocerca volvulus* transmission in Ecuador following mass Mectizan® Distribution. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68: 222-227.
- ²² HOWELL, S. (1973). The Isolation and Análisis of DNA from Eukaryotic Cells. *Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology*, Chrispeels, M, J., Ed., Wiley-Interscience Publication New York. pp. 126-132.
- ²³ HYNES, H. (1970). The ecology of stream insects. *Annual Review of Entomology*. 15: 25-42.
- ²⁴ INVITROGEN. (2004). ELISA Amplification System. Instruction Manual. CAT. NO. 19589-019.
- ²⁵ KATHOLI, C.R., BARKER, J. (2004). PoolScreen™ 2.0. Users Manual. University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.
- ²⁶ KATHOLI, C.R., UNNASCH, T.R. (1995). Poolscreen™ v1.1 University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.
- ²⁷ KATHOLI, C.R., TOÉ, L., MERRIWEATHER, A., UNNASH, T. R. (1995). Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. *Journal of Infectious Diseases*. 14: 248-259.
- ²⁸ MACKENZIE, CH., BURGESS, P., SISLEY, B. (1988). Onchocerciasis. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene* pp. 255-285.
- ²⁹ MANCERO, T. (1997). Ponencia presentada en el Congreso de Antropología. Perfil Oncocercótico en el Ecuador.
- ³⁰ MANCERO, T. (2004). Informe del componente clínico y parasitológico de las evaluaciones a profundidad en las comunidades centinela del área oncocercótica del Ecuador. pp. 4-34.

- ³¹ MEREDITH, S. E. O., LANDO, G., GBAKIMA, A. A., ZIMMERMAN, P. A., UNNASCH, T.R. (1991). *Onchocerca volvulus*: application of the polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Experimental Parasitology* 73: 335-344.
- ³² MERRIWEATHER, A., UNNASCH, T. R. (1996). *Onchocerca volvulus*: Development of a species specific polymerase chain reaction-based assay. *Experimental Parasitology* 83: 164-166.
- ³³ MURRAY, R. (1971). Teoría y Problemas de Estadística. Ediciones de Ciencia Técnica. Instituto Cubano del Libro. Impreso en Barcelona, España. pp. 69-180.
- ³⁴ ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. (2000). Certificación de la Eliminación de la Oncocercosis Humana: Criterios y Procedimientos. Reunión Ginebra, Suiza. Revista. pp. 23-34.
- ³⁵ PRIMROSE, S. (1995). Principles of Genome Analysis. A guide to Mapping and Sequencing DNA from different organisms. Blackwell Science. pp. 444-499.
- ³⁶ PROGRAMA NACIONAL PARA LA ELIMINACION DE LA ONCOCERCOSIS ECUADOR. (2005). Reporte y Censo de la Segunda Distribución de Ivermectina (Mectizan®) en el foco endémico principal de la provincia de Esmeraldas y los focos satélites.
- ³⁷ PROGRAMA PARA LA ELIMINACION DE LA ONCOCERCOSIS EN LAS AMERICAS -OEPA-. (2003). Distribución y características de la oncocercosis en las Américas. Guatemala. pp. 1-4.
- ³⁸ PROGRAMA PARA LA ELIMINACION DE LA ONCOCERCOSIS EN LAS AMERICAS -OEPA-. (2000). ¡¡Lo que usted debe conocer sobre la oncocercosis!!. Guatemala. pp. 1-4.
- ³⁹ ROBINSON, G. (1997). Bulletin of the Natural History Museum. Entomology Series. Impreso en Gran Bretaña. Vol. 66, N. 1, pp. 1-121.
- ⁴⁰ SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning, laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition. pp. 97-107.

- ⁴¹ SHELLEY, A. (1988). Biosystematics and medical importance of the *Simulium amazonicum* group and the *Simulium exiguum* complex in Latin America. *Biosystematics of haematophagus insects*. pp. 203-220.
- ⁴² SHELLEY, A. (1988). Vector Aspects of the Epidemiology of Onchocerciasis in Latin America. Department of Entomology, British Museum, London. United Kingdom. *Annual Review Entomology* 33: 337-364.
- ⁴³ SHELLEY, A., ARZUBE, M. (1985). Studies on the biology of the Simuliidae (Díptera) at the Santiago onchocerciasis focus in Ecuador, with special reference to the vectors and disease transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 79: 328-338.
- ⁴⁴ SHELLEY, A., ARZUBE, M., COUCH, C. (1989). The Simuliidae (Díptera) of the Santiago onchocerciasis focus in Ecuador. *Bulletin of the British Museum (National History)* (Entomology) 58: 79-130.
- ⁴⁵ SHELLEY, A., LOWRY, C., MAIA-HERZOG, M., LUNA DIAS, A., MORALES, M. (1997). Biosystematic studies on the Simuliidae (Díptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. *Bulletin of the British Museum (National History)* (Entomology) 66: 12-15.
- ⁴⁶ TALARO, K., TALARO, A. (2002). Foundations in Microbiology. McGraw Hill. Impreso en Estados Unidos. Cuarta Edición pp. 294-493.
- ⁴⁷ TORTORA, G., FUNKE, B., CASE, C. (2004). Microbiology An Introduction. Pearson Benjamin Cummings. Impreso en Estados Unidos. Octava Edición pp. 254-525.
- ⁴⁸ UNNASCH, T.R. (2005). Protocolo Adaptado a las Moscas Negras Sudamericanas. *Protocolo Completo para el Análisis de O-150 PCR en moscas negras infectadas con O. volvulus*.
- ⁴⁹ VARGAS, L. (1945). Simúlidos del Nuevo Mundo *Monografía del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 1: 1-241.
- ⁵⁰ VARGAS, L., DIAZ, A. (1951). Notas sobre sistemática y morfología de simúlidos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 12: 123-207.

- ⁵¹ VIEIRA, J.C. (1998). Determinación del impacto de la distribución masiva de ivermectina en dos focos hipoendémicos de oncocercosis en el Ecuador, con miras a iniciar el proceso de certificación de eliminación de la enfermedad, mediante indicadores entomológicos. Informe final E.EPI.98.3
- ⁵² VIEIRA, J.C. (2004). Informe del Primer Trimestre al Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA): Evaluación del Impacto de Ivermectina en las Comunidades endémicas del Ecuador.
- ⁵³ VIEIRA, J. C., BRACKENBORO, L., PORTER, C.H., BASAÑEZ, M., COLLINS R.C. (2005). Spatial and temporal variation in biting rates and parasite transmission potentials of onchocerciasis vectors in Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99: 178-195.
- ⁵⁴ WORLD HEALTH ORGANIZATION., W. (1995). Onchocerciasis and its control. WHO Technical Report Series, Geneva. Impreso en Suiza.
- ⁵⁵ WORLD HEALTH ORGANIZATION., W. (2000). Guidelines for certifying elimination of human onchocerciasis-draft. Who, Geneva.
- ⁵⁶ YAMÉOGO, L., TOÉ, L., HOUGARD, J. M., BOATIN, B. A., UNNASCH, T. R. (1999). Pool screen polymerase chain reaction for estimating the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium damnosum* sensu lato: Results of a field trial in an area subject to successful vector control. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 124-128.