

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar formas infectivas de *Onchocerca volvulus* en *Simulium metallicum s.l.* (Diptera: Simuliidae), en áreas endémicas de Venezuela

Alexis Fernández, Jaime Ramírez-Pérez, Harland Shuler & Noris Rodríguez*

Presentamos los resultados obtenidos después de un estudio parasitológico realizado en tres áreas endémicas de oncocercosis localizadas en los focos nor-central y nor-oriental de Venezuela. Durante aproximadamente 1 año, se capturaron hembras de simúlidos posándose sobre atractante humano en las márgenes de los ríos y las proximidades de las viviendas donde habían sido detectados casos de oncocercosis. Se capturaron un total de 95.251 moscas paras; de los cuales solo 0,05% correspondió a *Simulium exiguum s.l.* y el resto a *Simulium metallicum s.l.* Todos fueron sometidos a ruptura mecánica para separar cabezas y cuerpo. Las cabezas fueron separadas en grupos de 50 para la extracción de ADN genómico. El ADN fue utilizado para evaluar la infectividad natural por *Onchocerca volvulus*, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con oligonucleótidos especie-específicos. La prevalencia de moscas infectadas fue calculada mediante el programa Poolsreen ó prueba de grupo. Los resultados revelan larvas infectivas de *O. volvulus* en La Cuesta (Foco nor-oriental, estado Anzoátegui) con una prevalencia de 9/10.000; seguido por Santa Rosa (Foco nor-central, Estado Carabobo) con 5/10.000, el menor índice de prevalencia fue encontrado en La Carapa (Foco nor-oriental, Estado Monagas) con 3/10.000 de positividad, calculado con un intervalo de confianza de 95%. Estos resultados demuestran la utilidad de la técnica para estudios entomológicos a gran escala y la detección específica de larvas infectivas de *O. volvulus* causante de la oncocercosis en la población humana.

Palabras clave: Oncocercosis, *Simulium metallicum*, Entomología, PCR, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La oncocercosis o ceguera de los ríos es una enfermedad causada en el humano por el parásito nemátodo del género *Onchocerca*. En las Américas es causada por *Onchocerca volvulus*. Según OEPA (Onchocerciasis Elimination Program for the Americas), en las Américas existen 13 focos de oncocercosis distribuidos en 6 países; siendo éstos en orden de importancia epidemiológica: Colombia, Brasil, Ecuador, Venezuela, México y Guatemala. En Colombia sólo un 0,2% de la población se encuentra expuesta a riesgo mientras que en Guatemala este porcentaje es del 38,8%. Según el mismo reporte de

OEPA (2007) en Venezuela el 22% de la población se encuentra en riesgo en 521 comunidades endémicas.

En Venezuela la oncocercosis está distribuida geográficamente en tres focos (Vivas-Martínez *et al.*, 2007): Nor-Oriental (Sucre, Anzoátegui y Monagas), Nor-Central (Miranda, Carabobo, Guárico, Cojedes y Yaracuy) y el Sur (Bolívar y Amazonas). El primer caso de oncocercosis en el país fue reportado en el año 1948 en el estado Monagas (Potenza *et al.*, 1948). Los vectores de la oncocercosis son dípteros del género *Simulium* de la familia Simuliidae. Las especies comprometidas en la transmisión de la enfermedad son numerosas y varían de un foco a otro (Vivas-Martínez *et al.*, 2007). En el foco norte de Venezuela, el vector más importante es *S. metallicum s.l.* ya que es la única especie que ha sido detectada naturalmente infectada con las formas infectantes de *O. volvulus* (Ramírez-Pérez *et al.*, 1977). Su papel como vector principal de

Instituto de Biomedicina, San Nicolás a Providencia, San José.
Caracas. Apdo Postal 4049 Caracas 1010A. Venezuela

*Autor de correspondencia: nmrodriz@gmail.com

la oncocercosis en dicho foco, ha sido confirmado ya que dicha especie es predominantemente antropofílica (Lewis & Ibáñez de Aldecoa, 1964; Grillet *et al.*, 1994; Basáñez *et al.*, 2000).

Tradicionalmente la detección de microfilarias en humanos se realiza mediante la búsqueda del parásito en biopsias de piel (WHO, 1995). En los simúlidos (moscas negras), la identificación de larvas del parásito se realiza después de la disección de los insectos y observación minuciosa al microscopio, resultando en un proceso que consume mucho esfuerzo y tiempo, por el gran número de moscas que deben ser disecadas hasta encontrar una positiva. Los nuevos desarrollos en la biología molecular permiten que las técnicas para la detección de *O. volvulus* sean más sensibles y específicas (Erttmann *et al.*, 1987).

La tecnología del ADN recombinante es una herramienta poderosa para el estudio de filarias (Greene & Unnasch., 1986). La aplicación de esta tecnología ha permitido detectar secuencias repetidas en el genoma de *Onchocerca volvulus*, las cuales fueron designadas como la familia O-150 (Meredith *et al.*, 1989, 1991). La identificación de estas secuencias permitió diseñar una serie de oligonucleótidos específicos para la detección de *O. volvulus*, en cualquiera de sus formas, tanto en el humano como en el vector. El uso de los oligonucleótidos O-150 en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido detectar un sólo individuo infectado en grupos que contenían más de 100 individuos (Zimmerman *et al.*, 1993, 1994; Boatín *et al.*, 1998; Rodríguez-Pérez, 2005). Recientemente, se describió un programa para computadoras con un algoritmo estadístico conocido como "Poolscreen", el cual fue diseñado para calcular el índice de infección en una población de *Simulium* spp. Dicho programa utiliza el tamaño del grupo estudiado y el porcentaje de grupos negativos obtenidos por PCR (Katholi *et al.*, 1995). Este método permite predecir con exactitud el número de individuos infectados en una población de vectores, siendo de singular importancia su aplicación en áreas donde se han aplicado medidas de control y por ende la tasa de infección es baja (Yameogo *et al.*, 1999; Guevara *et al.*, 2003; Rodríguez Pérez *et al.*, 2004).

En el presente trabajo reportamos los resultados obtenidos al realizar un estudio parasitológico, utilizando para ello la técnica de PCR/ Poolscreen, con oligonucleótidos especie-específicos para la detección de infección natural por larvas infectivas (L3) de *Onchocerca volvulus* en *Simulium* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio fue realizado previamente al tratamiento con Mectizan®, en tres comunidades centinelas de tres estados de Venezuela, las cuales se seleccionaron en base al registro de casos humanos; las mismas tienen un seguimiento especial a través de la realización periódica de una evaluación epidemiológica en profundidad. Todas las áreas del estudio son consideradas hiperendémicas con una prevalencia de microfilarias superior al 60% en evaluación epidemiológica rápida realizada mediante la toma de biopsias en ambas escapulas de los pacientes; las biopsias se colocan en placas de ELISA con solución salina para su posterior observación al microscopio. Las capturas fueron realizadas mensualmente en las siguientes comunidades: Santa Rosa (09°54'13" N; 67°31'59" O; 825 m snm en el estado Carabobo en el foco nor-central; con una población de 242 habitantes y prevalencia de microfilarias del 70%; allí la captura se realizó entre Agosto 1998 y Octubre 1999; La Carapa (10°06'06" N; 63°46'36" O; 648 m snm) en el estado Monagas, con una población elegible de 202 habitantes y una prevalencia de 73,3%; en esta comunidad se capturó entre Octubre 1998 y Septiembre 1999 y La Cuesta (10°00'26" N; 64°23'32" O; 239 m snm) en el estado Anzoátegui, con una población elegible de 217 habitantes y una prevalencia de 68,8%, donde las capturas fueron realizadas entre Abril de 1999 y Marzo de 2000; pertenecientes ambas al foco nor-oriental.

Captura de adultos de *Simulium* spp (moscas negras)

Las capturas se realizaron diariamente en horario comprendido entre las 7:00 am y las 4:00 pm durante 5 días a la semana; los insectos fueron capturados siguiendo procedimientos estandarizados (Walsh *et al.*, 1978), con aspiradores manuales al posarse sobre atrayentes humanos; todos los participantes recibieron Mectizan® antes de comenzar la colección. Para el estudio se seleccionaron las moscas paras, las cuales fueron seleccionadas en el campo en base a la ingesta de sangre y preservadas inmediatamente en isopropanol al 95%. Posteriormente en el laboratorio, fueron clasificadas entomológicamente siguiendo los criterios descritos por Ramírez-Pérez *et al.* (1982) y Ramírez-Pérez (1983). Una vez identificadas, fueron separadas en grupos de 50 individuos. Seguidamente, las moscas fueron pasadas por un tamiz para separar las cabezas del cuerpo. Solamente se realizó la extracción

de ADN para el análisis de infectividad por PCR a las cabezas (en grupos de 50), garantizando de esta manera detectar las larvas infectivas o formas L3 que son las que poseen la capacidad de infectar al individuo para producir la enfermedad. Los cuerpos (tórax y abdomen) fueron preservados en isopropanol para futuros estudios.

Aislamiento de el ADN genómico

Los grupos de cabezas fueron homogenizados con buffer de lisis {100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton X-100} utilizando un homogenizador eléctrico (Pellet pestle kontes). Posteriormente se le añadió al homogenato proteinasa K (400µg/mL) y se incubó a 55°C durante 2 horas. Seguidamente se realizó una extracción fenol/cloroformo (1:1). La fase acuosa rica en ADN genómico fue purificada por absorción con fibra de vidrio (glass slurry) y tres volúmenes de ioduro de sodio (Meredith *et al.*, 1991). Seguidamente se centrifugó a 12000 rpm por 1min; el sobrenadante se descartó y el sedimento fue resuspendido en 50µL de TE. Las muestras fueron incubadas a 55°C por 5min y luego centrifugadas 2min a 1200rpm. El sobrenadante que contiene el ADN genómico, fue diluido 1/10, luego se calentó durante 5 minutos a 100°C y posteriormente se almacenó a 4°C hasta su uso.

Amplificación por PCR

La mezcla de reacción se realizó con 5µL (100ng) de ADN genómico, 2,5µL buffer 10X PCR (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4; 15mM MgCl₂, 0,01% gelatina), 5µL de deoxinucleótidos (10mM dATP, 10mM dGTP, 10mM dCTP, 10mM dTTP), 200ng de cada uno de los siguientes primers: Ov1 (5'GATTYTTCCGRCGAAXARCGC3') y Ov2 (5'GCXRTRTAAATXTGXAAATTC3'), y 1U Taq ADN polimerasa (Gibco BRL). La mezcla de reacción fue cubierta con dos gotas de aceite mineral. El proceso de amplificación consistió en un ciclo con denaturación del ADN a 94°C durante 6min, continuando con la alineación de los primers a 37°C por 2min, luego 45 ciclos de amplificación, donde cada ciclo comprende: denaturación a 94°C por 1 min, alineación de los primers a 37°C por 1min, luego la extensión a 72°C por 30seg utilizando un termociclador (Biometra, trio block, UK). La extensión final se realizó durante 10min a 72°C. Para comprobar los resultados de la amplificación, 10µl de los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó

en buffer TBE 1X a 70V. Posteriormente se visualizó la presencia de bandas de amplificación por medio de luz UV y se tomó un registro fotográfico con una cámara Polaroid con película 665.

Calculo de la prevalencia de infectividad

La prevalencia de infectividad en poblaciones de *S. metallicum s.l.* fue determinada mediante el uso de un programa de computación conocido como Poolscreen (Katholi *et al.*, 1995). El método de Poolscreen ó prueba de grupo está basado en un algoritmo que permite el análisis de grupos de organismos de una misma especie para determinar la proporción de organismos infectados en una población en estudio. Este programa requiere que el número de individuos, en este caso (moscas) utilizadas; sea el mismo en cada grupo. Además se requiere conocer el número total de grupos y el número de grupos negativos analizados por PCR.

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

$$P = 1 - \sqrt[n]{k/m}$$

donde P es la prevalencia, *n* es el número de grupos en estudio, *m* es el número de individuos por grupo y *k* es el número de grupos negativos. El Poolscreen fue utilizado en este estudio, para calcular la prevalencia de moscas infectivas capturadas en las diferentes comunidades utilizando para ello grupos de 50 cabezas; el intervalo de confianza que estima el programa es del 95%.

RESULTADOS

Determinación de la infección natural de S. metallicum s.l. con O. volvulus por PCR

El 99,5% de las moscas capturadas correspondió a la especie *Simulium metallicum s.l.* La Fig. 1 es una muestra de los resultados obtenidos después de la amplificación por PCR con los oligonucleotidos Ov1 y Ov2 en grupos de 50 cabezas

de *S. metallicum s.l.* Las líneas 1 y 2 son grupos donde la reacción fue negativa indicando la ausencia de *O. volvulus*, en cambio las líneas 3 al 10 son muestras de grupos donde se observa la banda diagnóstica de 150 pb para *O. volvulus*, la cual está presente en el control positivo de *O. volvulus* aislada de humano (línea 11).

El número total de grupos de cabezas con PCR positivos en Santa Rosa fue de 25, los cuales corresponden a los meses de Mayo (11), Agosto (1), Septiembre (10) y Noviembre (3) (Tabla 1). En La Cuesta se analizaron 414 grupos de *Simulium metallicum s.l.* durante el año de estudio, determinándose 18 grupos positivos por PCR distribuidos en los meses de Diciembre (1), Febrero (1) y Agosto (16). En La Carapa de un total de 540 grupos estudiados se pudieron detectar 8 grupos positivos por PCR, ubicados en los meses de Abril (1), Mayo (3), Agosto (1), Septiembre (1) y Diciembre (2).

Prevalencia de infectividad calculada mediante el programa Poolscreen

Un total de 95.271 *Simulium spp.* fueron capturados en las tres comunidades estudiadas, los cuales corresponden casi en su totalidad a *S. metallicum s.l.*, ya que sólo se capturaron 47 *S. exiguum s.l.* los cuales resultaron negativos por PCR. En la Tabla I se muestra el número de individuos por comunidades, así como el número de grupos evaluados con la respectiva positividad e índice de infección natural calculado según el método descrito. El mayor número de *Simulium metallicum s.l.*

fue capturado en la comunidad de Santa Rosa del Sur en el estado Carabobo, sin embargo el mayor índice de positividad por PCR de las cabezas fue obtenido para la comunidad de La Cuesta en el estado Anzoátegui (0,0009= 9/10.000) en comparación con 5/10.000 para la comunidad de Santa Rosa y 3/10.000 para La Carapa en el estado Monagas. En la Fig. 2 se observa el porcentaje de infección natural por captura mensual, obteniéndose que para la comunidad de La Cuesta el mes de mayor riesgo de infección para humanos es Agosto, donde se obtiene el mayor porcentaje de grupos infectados (3,98%); para Santa Rosa en cambio hay dos picos de mayor riesgo que son Mayo y Septiembre con 1,5% de grupos infectados, mientras que en La Carapa este pico se encuentra en Mayo y Diciembre aunque el número de grupos infectados es menor que en las otras dos comunidades (menor del 1%).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron tres comunidades hiperendémicas de los focos nor-central (Santa Rosa del Sur) y nor-oriental (La Carapa y La Cuesta) las cuales fueron elegidas en base a la prevalencia de la infección por microfilarias determinada previo a este estudio (Sección de Oncocercosis, Instituto de Biomedicina), además de otros factores como son accesibilidad al área de estudio y el número de habitantes en la comunidad.

Clásicamente la detección de *O. volvulus* en el vector se ha llevado a cabo mediante la disección

Tabla I. Infección natural de *Simulium spp.* a *Onchocerca volvulus* en diferentes estados de Venezuela.

Comunidad	Nº Total Simulidos	Nº Total Grupos	Grupos Totales/ grupos Negativos	Grupos PCR Positivos	% Grupos PCR Positivos	Prevalencia*
SANTA ROSA DEL SUR Edo. Carabobo	47485	949	949/924	Mayo 11 Agosto 1 Septiembre 10 Noviembre 3 Total 25	2,63	0,0005 (0,0003 ; 0,0008)
LA CUESTA Edo. Anzoátegui	20699	414	414/396	Diciembre 1 Febrero 1 Agosto 16 Total 18	4,35	0,0009 (0,0005 ; 0,0014)
LA CARAPA Edo. Monagas	27077	540	540/532	Abril 1 Mayo 3 Agosto 1 Septiembre 1 Diciembre 2 Total 8	1,48	0,0003 (0,0001 ; 0,0059)

Fig. 1. Productos de amplificación por PCR de muestras de grupos de 50 cabezas de *Simulium metallicum s.l.*, utilizando los primers Ov1 y Ov2, separados en gel de agarosa al 3% a 75 Volts. Líneas 1-2.- grupos no infectados; Líneas 3-5.- grupos de Sta. Rosa ; Líneas 6-7.- grupos de La Cuesta; Líneas 8-9.- grupos de La Carapa; Línea 10.- Control Positivo ADN genómico de *Onchocerca volvulus* aislada de paciente; Línea 11.- Control negativo; Línea 12.- 100bp DNA ladder (Gibco-BRL).

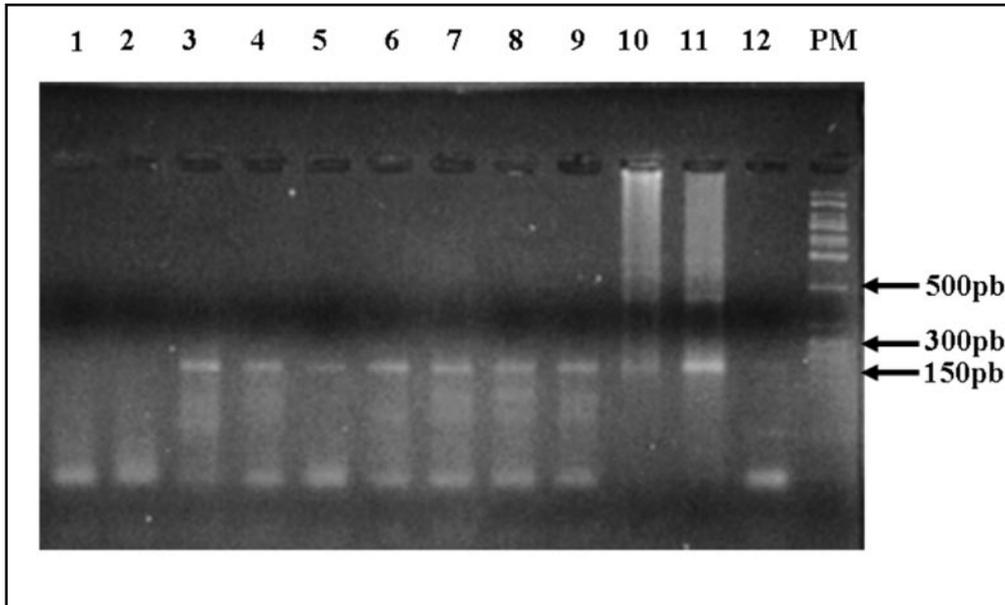
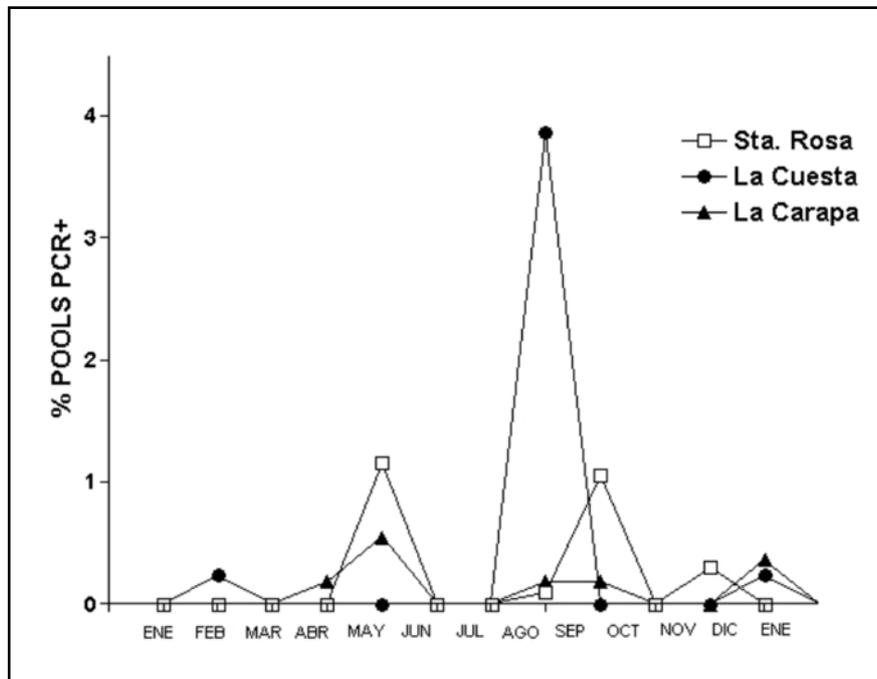


Fig. 2. Porcentaje de positividad a *Onchocerca volvulus* en grupos de *Simulium metallicum s.l.* capturados mensualmente en las tres comunidades estudiadas.



manual de las moscas de la especie involucrada en la transmisión de la oncocercosis. Sin embargo, con el advenimiento de los fármacos microfilaricidas como el Mectizan®, y la consecuente disminución de la infección (Guevara *et al.*, 2003), la disección de moscas es poco eficiente para realizar evaluaciones epidemiológicas en profundidad, sobre todo en América donde las tasas de infección son bajas y sobre todo después del tratamiento masivo con ivermectina, por lo que haría falta la disección de un gran número de individuos para obtener resultados estadísticamente significativos (Oskam *et al.*, 1996). En este sentido, la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos es de gran ayuda en los estudios epidemiológicos a gran escala, tal como ha sido demostrado en Ecuador (Guevara *et al.*, 2003) y México (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004).

En este estudio, los resultados obtenidos mediante PCR utilizando los primers específicos para la identificación de *O. volvulus*, demuestra que en las tres comunidades, *S. metallicum s.l.* resultó infectado con larvas L3 de *O. volvulus*, lo cual confirma su papel como vector de este parásito en la región nor-central y nor-oriental del país, tal como ha sido previamente reportado utilizando otras metodologías (Peñalver, 1961; Lewis & Ibáñez de Aldecoa, 1962; Ramírez-Pérez *et al.*, 1977a; Grillet *et al.*, 1994; Basáñez *et al.*, 2000). Esta especie no ha sido reportada en el foco Sur de Venezuela donde se ha demostrado que *S. guianense s.l.*, *S. incrustatum* y *S. oyapockense s.l.* son los vectores más eficientes para la transmisión de *O. volvulus* (Basáñez *et al.*, 1988; Vivas-Martínez *et al.*, 2007). Sin embargo en este estudio también se capturaron algunos ejemplares (47) de *S. exiguum s.l.* los cuales resultaron negativos a la prueba de PCR, por lo que no pudimos demostrar su participación en la transmisión de la oncocercosis en las áreas estudiadas. El método del Poolscreen/PCR es una herramienta útil para el estudio a gran escala de poblaciones de *Simulium* (Guevara *et al.*, 2003; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2004, 2006). En los países de América Latina donde se aplica el programa para la eliminación de la oncocercosis (OEPA), esta metodología es de particular importancia, ya que permite realizar un seguimiento anual del índice de infección y por ende de la transmisión de la oncocercosis en las áreas endémicas donde se aplica el tratamiento masivo con Mectizan®. De acuerdo con lineamientos acordados por la OEPA y la Organización Mundial de la Salud se considerará que se ha alcanzado la supresión de la transmisión cuando la prevalencia de moscas infectivas es menor

que 1/10.000 (WHO, 2001), donde exista una línea de base sobre la infectividad por L3 en *Simulium* spp antes de comenzar el tratamiento. Sin embargo, para obtener el poder estadístico suficiente para realizar comparaciones robustas, la Reunión de Entomólogos celebrada en Guatemala durante 26-27 de Septiembre de 2006, acordó que aunque deben capturarse al menos 10.000 moscas, el criterio para declarar la interrupción de la transmisión debería estar expresado en menos de una mosca infectada por 2000 hembras colectadas (asumiendo una tasa de paridad del 50%). Sin embargo este criterio no ha sido aún incluido en la guía para la certificación de la eliminación de la oncocercosis por la OMS. La técnica PCR/Poolscreen resulta fácil de aplicar, siendo altamente sensible y específica para la detección de larvas L3 de *O. volvulus*, ya que permite la detección hasta de un sólo individuo infectado en un grupo de 50, evitando el laborioso proceso de la disección de las cabezas, donde pueden encontrarse las formas infectivas, lo cual consume mucho tiempo.

Se estima que la disección de 700 moscas negras podría tomar entre 24 y 36 horas (Oskam *et al.*, 1996), en cambio la técnica de PCR del mismo número de moscas puede realizarse en tres horas y con la ventaja de poder confirmar la presencia de formas infectivas y la especie del parásito infectante, sobre todo cuando se trata de bajos niveles de infectividad en la población estudiada, como ocurre en el foco norte de Venezuela y en las poblaciones que están siendo sometidas a tratamiento.

Los resultados obtenidos en este estudio, también permiten inferir las épocas de mayor riesgo para la infección, que es el periodo donde se localizan el mayor número de moscas infectadas con las larvas L3; este periodo es diferente para cada comunidad, lo cual probablemente es dependiente de las épocas de lluvia y sequía en las distintas zonas del país, tal como ha sido reportado por Ramírez Pérez *et al.* (1977) en estudios realizados en el área nor-central del país, incluyendo el foco de Santa Rosa donde reportaron una prevalencia de 13%, en el mes de Marzo, época de máxima sequía; sin embargo no podemos afirmar si esta positividad es alta en comparación con la obtenida en este estudio, ya que el método aplicado nos permite sólo determinar el número de grupos positivos, los cuales se encuentran en el mes de Mayo (11 grupos positivos) y en Septiembre (10 grupos positivos), lo que representa un total de 2,63% grupos positivos, pero no podemos determinar el número exacto de moscas positivas en cada grupo, lo cual es una desventaja para el método. Para la

comunidad de La Cuesta, el mayor número de grupos positivos se encontró en Agosto (4,35% de grupos positivos), hallándose en esta comunidad la mayor prevalencia de infectividad (9/10.000); para La Carapa la mayor positividad también se encuentra en Mayo, en esta comunidad se registró la menor prevalencia de infectividad (3/10.000). Los meses donde se encuentra el mayor número de grupos positivos coinciden con épocas posteriores a las lluvias en cada comunidad, ya que durante el periodo lluvioso no se realizaron capturas. Los resultados de infectividad natural de *S. metallicum s.l.* con *O. volvulus*, obtenidos en este estudio en La Cuesta y La Carapa son los primeros reportados en el país para estas localidades.

Estudios realizados en áreas endémicas de oncocercosis de México, Brasil y Guatemala utilizando la misma metodología (Marchón-Silva *et al.*, 2007; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006; Lindblade *et al.*, 2007) han contribuido al monitoreo de la transmisión después de la aplicación del tratamiento para cumplir con el programa de la OEPA, habiéndose declarado varias comunidades libre de transmisión, cumpliendo con los requisitos de la WHO (2001) para declarar supresión de la transmisión de oncocercosis. Recientemente se reportó la eliminación de la enfermedad en cinco comunidades centinelas del Ecuador, después de un largo periodo de tratamiento con Mectizan®, no encontrándose microfilarias en la cámara anterior del ojo de las personas tratadas; así mismo la prevalencia de infección en *Simulium* fue 0/10.000 moscas estudiadas, aunque dos comunidades (El Tigre y San Miguel) de las 7 comunidades centinelas en ese país aún poseen una prevalencia de infección de 6,0 y 0,8/10.000 moscas respectivamente, determinada aplicando el PCR/poolscreen (Vieira *et al.*, 2007). Esta técnica ha sido también aplicada al estudio de infección natural de flebotomos, transmisores de *Leishmania*, demostrándose su aplicabilidad a la vigilancia epidemiológica de la leishmaniasis en áreas endémicas (Martín-Sánchez *et al.*, 2006)

Las metas planteadas por la OEPA en cuanto a la eliminación de la oncocercosis en América, deben también ser cumplidas en Venezuela, por lo que los resultados aquí reportados pueden constituir la línea de base para seguir los efectos del tratamiento en el foco norte, mediante el monitoreo de la infección natural de *Simulium* después de la aplicación masiva de Mectizan® en las áreas endémicas, el cual se viene aplicando en los últimos años. Sin embargo para el año 2006 según la relatoría de la XVI Conferencia

Interamericana sobre Oncocercosis celebrada entre el 7-9 de Noviembre en Antigua (Guatemala) se mencionó que aún existe transmisión en varias comunidades de las áreas nor-central donde la prevalencia de microfilarias en piel oscila entre 0,7 y 16,7% y en el foco nor-oriental donde en el 2006 la prevalencia de microfilarias en cámara anterior del ojo fue del 3,3%, aunque en algunas comunidades este parámetro fue cero. Sin embargo aún falta por realizar las evaluaciones entomológicas en esas áreas para evaluar la situación de la transmisión después de la aplicación de varias rondas de Mectizan®.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Control de Enfermedades Endémicas, Proyecto VEN/97/002/02122; a Hecdy M. Rodríguez y Vimerca Oliveros por su asistencia técnica, y a los revisores por sus comentarios.

Polymerase chain reaction (PCR) for detecting infective forms of *Onchocerca volvulus* in *Simulium metallicum s.l.* (Diptera: Simuliidae) in Venezuelan endemic areas

SUMMARY

We present the results obtained after a parasitological study carried out in three onchocerciasis endemic areas located in the North-Central and North-Oriental foci in Venezuela. During one year, adult females of *Simulium* spp. were captured when landing on human attractants along rivers and in the proximity of houses where onchocerciasis cases had been detected. A total of 95,251 black flies were captured, from this total, only 0.05% were identified as *S. exiguum s.l.* and the rest were *Simulium metallicum s.l.* All the specimens were submitted to mechanical disruption for head and body separation. The heads were grouped in pools of 50 for genomic DNA extraction. The DNA was used to evaluate the natural infectivity by *O. volvulus* using the Polymerase Chain Reaction technique with species specific oligonucleotides. The prevalence of infective flies, was calculated using the Poolscreen program; the results indicated a positivity of 9/10,000 flies for the locality of La Cuesta (North-eastern focus, Anzoátegui State), followed for Santa Rosa (North-Central focus, Carabobo State) with a prevalence of 5/10,000, and finally La Carapa (North-eastern focus,

Monagas State) with the lowest index (3/10,000) of infectivity. These results are demonstrating the utility of the technique for large scale entomological studies and the specific detection of *O. volvulus*, infective larvae, the causal agent of human onchocerciasis

Key words: Onchocerciasis, *Simulium metallicum*, Entomology, PCR, Venezuela

REFERENCIAS

- Boatin B. A., Toé L., Alley S., Dembélé N., Weiss N. & Dadzie K. Y. (1998). Diagnostics in onchocerciasis: future challenges. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **92**: 41-45.
- Basáñez M. G., Yarzabal L., Takaoka H., Suzuki H., Noda S. & Tada I. (1988). The vectorial role of several blackfly species (Diptera: Simuliidae) in relation to human onchocerciasis in the Sierra Parima and upper Orinoco regions of Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **82**: 597-611.
- Basáñez M.-G., Yarzabal L., Frontado H. L. & Villamizar N. J. (2000). *Onchocerca* – *Simulium* complexes in Venezuela: can human onchocerciasis spread outside its present endemic areas?. *Parasitology.* **120**: 143-160.
- Erttmann K. D., Unnasch T. R., Greene B. M., Albiez E. J., Boateng J., Denke A. M., *et al.* (1987). A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. *Nature.* **327**: 415 - 417.
- Greene B. M. & Unnasch T. R. (1986). Molecular biologic approaches to research in onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **154**: 1024-1026.
- Grillet M. E., Botto C., Basáñez M. G. & Barrera R. (1994). Vector competence of *Simulium metallicum* s.l (Diptera: Simuliidae) in two endemic areas of human onchocerciasis in Northern Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **88**: 65-75.
- Guevara A. G., Vieira J. C., Lilley B. G., Lopez A., Vieira N., Rumbea J., *et al.* (2003). Entomological evaluation by pool screen polymerase chain reaction of *Onchocerca volvulus* transmission in Ecuador following mass Mectizan distribution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**: 222-227.
- Katholi C. R., Toé L. & Unnasch T. R. (1995). Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by PCR screening of pools of black flies. *J. Infect. Dis.* **172**: 1414 - 1417.
- Lewis D.J & Ibañez de Aldecoa R. (1962). Simuliidae and their relation to human onchocerciasis in northern Venezuela. *Bull. World Health Organization.* **27**: 449-464.
- Lindblade K. A., Arana B., Zea-Flores G., Rizzo N., Porter C. H., Domínguez A., *et al.* (2007). Elimination of *Onchocerca volvulus* transmission in the Santa Rosa focus of Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 334-341.
- Marchón-Silva V., Charles Caer J., James Post R., Maia-Herzog M. & Fernández O. (2007). Detection of *Onchocerca volvulus* (Nematode: Onchocercidae) infection in vectors from Amazonian Brazil following mass Mectizan TM distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**: 197-202.
- Martin-Sánchez J., Gallego M., Barón S., Castllejo S. & Morillas-Márquez F. (2006). Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: 527-532.
- Meredith S. E. O., Unnasch T. R., Karam M., Piessens W. F. & Wirth D. F. (1989). Cloning and characterization of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**: 1-10.
- 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. *Exp. Parasitol.* **73**: 335-344.
- OEPA (2007). Noti-oncocercosis: Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Americas.
- Oskam L., Schoone G. J., Kroon C. C. M., Lujan R. & Davies J. B. (1996). Polymerase Chain Reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of blackflies. *Trop. Med. Int. Health.* **1**: 552-527.
- Perler F. B. & Karam M. (1986). Cloning and characterization of two *Onchocerca volvulus* repeated DNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**: 171-178.

- Potenza L., Febres-Cordero R. & Andueza P. L. (1948). Oncocercosis humana en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*. **56**: 219-220.
- Peñalver L. M. (1961). Estudio de un foco de oncocercosis en la región central de Venezuela. Determinación de *Simulium metallicum* y *Simulium exiguum* como transmisores de la enfermedad en Venezuela. *Rev. Ven. San. Asist. Soc.* **26**: 898-912
- Ramírez-Pérez J. (1977). *Estudio sobre la morfología de Simulium metallicum, vector de la oncocercosis humana en Venezuela*. Publicación Científica N° 338. OPS/OMS, Washington, USA.
- Ramírez-Pérez J. (1983). *Los jejenes de Venezuela*. Simposio de Oncocercosis Americana. CAÍCET, Puerto Ayacucho. 1-156.
- Ramírez-Pérez J., Rassi E., Convit J. & Ramírez, A. (1977). Índice de infección natural de *Simulium metallicum* (Diptera: Simuliidae) por formas evolutivas de *Onchocerca volvulus* en Venezuela. *Bo. Oficina Sanit. Panam.* **82**: 322-326.
- Ramírez-Pérez J., Yarzabal L. & Peterson, B. (1982). La simuliofauna del Territorio Federal Amazonas (Venezuela). Publicación Científica 1. Caracas: PROICET Amazonas. 1-104.
- Rodríguez-Pérez M. A., Lilley B. G., Domínguez-Vazquez A., Segura-Arenas R., Lizarazu-Ortega C., Mendoza-Herrera A., Reyes-Villanueva F. & Unnasch T. (2004). Polymerase Chain Reaction monitoring of transmisión of *Onchocerca volvulus* in two endemic states in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 38-45.
- Rodríguez-Pérez M. A. (2005). Herramientas moleculares para el combate de la oncocercosis en México. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**: 112-129.
- Rodríguez-Pérez M. A., Katholi Ch. R., Hassan H. K. & Unnasch T. R. (2006). Large-Scale entomologic assessment of *Onchocerca volvulus* transmission by Poolscreen PCR in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**: 1026-1033.
- Vivas-Martínez S., Grillet M. E., Botto C. & Basáñez M. G. (2007). La oncocercosis humana en el foco Amazónico. *Bol. Malariol. San. Amb.* **47**: 15-46.
- Vieira J. C., Cooper P. J., Lovato R., Mancero T., Rivera J., Proaño R., et al. (2007). Impact of long-term treatment of onchocerciasis with ivermectin in Ecuador: Potential for elimination of infection. *BMC Med.* **23**: 5-9.
- Walsh J. F., Davies J. B. & Garms R. (1978). Standardization of criteria for assessing the effects of *Simulium* control in onchocerciasis control programs. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 675-676.
- WHO (1995). Onchocerciasis and its control. Report of WHO expert committee on Onchocerciasis Control. Technical Report Series N° 852. Geneva, Switzerland.
- WHO (2001). Criteria for certification of interruption of transmission/Elimination of human onchocerciasis. Geneva, Switzerland.
- Yameogo L., Toe L., Hougard J. M., Boatín B. A. & Unnasch T. R. (1999). Pool Screen Polymerase Chain Reaction for estimating the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in *Simulium damnosum* s.l. Results of a field trial in an area subject to successful vector control. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 124-128.
- Zimmerman P. A., Toe L. & Unnasch T. R. (1993). Design of *Onchocerca* DNA probes based upon analysis of a repeated sequence family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 259-268.
- Zimmerman P. A., Guderian R. H., Araujo E., Elson L., Phadke P., Kubofcick J. & Nutman T. B. (1994). Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. *J. Infect. Dis.* **169**: 686-689.

Recibido el 30/10/2007
Aceptado el 25/03/2008

