

**Guía para la detección de una Potencial Recrudescencia
durante el periodo de Vigilancia Epidemiológica
Postratamiento (VEPT)**

Nota: Versión adaptada por OEPA para ser distribuida entre los Programas Nacionales, con base en el documento original en inglés producido por el Comité Coordinador (PCC)

Versión noviembre de 2011

ÍNDICE

Lista de Términos	2
Introducción	3
El rol del PCC	4
Orígenes del concepto de Vigilancia Epidemiológica Postratamiento	4
Definición de la VEPT.....	5
Principios de la VEPT	5
Continuidad de las actividades programáticas durante el periodo VEPT	6
Expectativa de la evolución de la Recrudescencia.....	6
Lineamientos básicos de la VEPT	7
Componente 1: Intervenciones educativas durante el periodo VEPT	7
<i>1.1 Actividades educativas para personal vinculado al programa</i>	<i>7</i>
<i>1.2 Actividades educativas con las comunidades</i>	<i>7</i>
<i>1.3 Acompañamiento del equipo del nivel central del programa</i>	<i>7</i>
Componente 2: Evaluaciones durante la VEPT.....	8
<i>2.1 Evaluación entomológica</i>	<i>8</i>
<i>2.2 Encuesta serológica.....</i>	<i>8</i>
<i>2.3 PCR en biopsia de piel de niños positivos por serología.....</i>	<i>9</i>
<i>2.4 Discusión sobre la edad de los niños a ser evaluados por serología</i>	<i>9</i>
<i>2.5 Métodos complementarios para estudio de recrudescencia</i>	<i>10</i>
• Evaluación de comunidades centinela por biopsia de piel	10
• Búsqueda nódulos.....	10
<i>2.6 El proceso de toma de decisiones.....</i>	<i>10</i>
<i>2.7 ¿Qué hacer ante la detección de una Potencial Recrudescencia?</i>	<i>12</i>
Componente 3. Preparación de un informe a ser presentado ante la OPS/OMS como soporte de la solicitud de certificación de eliminación.....	13
Solicitud de certificación de eliminación a la OPS/OMS, por país	13
Anexos.....	14
Anexo 1: Calendario de actividades en el proceso hacia la eliminación de la Oncocercosis	14
Anexo 2: Evaluación Entomológica.....	15
Anexo 3: Evaluación serológica	18
Anexo 4: Vigilancia de nódulos	20
Anexo 5: Comunidades Centinelas	21
Referencias	22

Lista de Términos

<i>ADN:</i>	Ácido Desoxirribonucleico.
<i>CPE:</i>	Comunidades Potencialmente Endémicas.
<i>DPE:</i>	Densidad de Picada Estacional.
<i>EEP:</i>	Evaluaciones Epidemiológicas en Profundidad.
<i>ELISA:</i>	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, por sus iniciales en inglés.
<i>EuSIMON:</i>	Euphoria Simulation MOdel of ONchocerciasis –EuSIMON- por sus siglas en inglés, es el nombre del modelo matemático en lenguaje de programación Euphoria creado para simular escenarios de comunidades endémicas y obtener predicciones de resultados epidemiológicos.
<i>IC:</i>	Intervalo de Confianza.
<i>L₁, L₂ y L₃:</i>	Estadios infectivos de las larvas.
<i>Mf:</i>	Microfiliarias.
<i>MfC:</i>	Microfilarias en Córnea.
<i>MfCA:</i>	Microfiliarias en la Cámara Anterior.
<i>OPS:</i>	Organización Panamericana de la Salud.
<i>OMS:</i>	Organización Mundial de la Salud.
<i>Ov-16:</i>	Antígeno recombinante pre-patente de <i>O. volvulus</i> .
<i>PCC:</i>	Comité Coordinador del Programa (OEPA), por sus siglas en inglés.
<i>PCR:</i>	Prueba de Reacción en Cadena a la Polimerasa, por las iniciales de su nombre en inglés.
<i>PR:</i>	Potencial Recrudescencia.
<i>PTA:</i>	Potencial de Transmisión Anual.
<i>PTE:</i>	Potencial de Transmisión Estacional.
<i>R_o:</i>	Tasa de reproducción, que es una medida del éxito reproductivo de la población del parásito.
<i>TI:</i>	Tasa de infectividad.

Introducción

La Oncocercosis (ceguera de los ríos) es causada por el parásito *Onchocerca volvulus* transmitido por un vector y considerada endémica en 13 focos distribuidos en 6 países de la región de las Américas: Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela. El Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas (OEPA) es una coalición regional que incluye a los países endémicos, la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS), el Centro Carter, la Fundación Internacional de Clubes de Leones y los clubes locales, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, la Fundación Bill y Melinda Gates, varias universidades, el Programa de Donación de Mectizan® y Merck & Co. La estrategia de la iniciativa es administrar ivermectina (Mectizan®), un medicamento seguro y efectivo, donado por Merck & Co., al menos cada 6 meses, con una cobertura mínima del 85% de la población elegible. OEPA actualmente opera según el mandato de la Resolución CD48.R12 del Consejo Directivo de la OPS de 2008, que hace un llamado a eliminar la morbilidad ocular causada por oncocercosis e interrumpir la transmisión del parásito para el 2012 (OPS, 2008).

En 2001, la OMS publicó el documento “Certificación de la Eliminación de la Oncocercosis Humana: Criterios y Procedimientos.”, en el cual establece las diferentes fases a seguir para lograr la certificación de eliminación de la oncocercosis en un país. En cada una de estas fases se describe el estado de la transmisión señalando las siguientes categorías (Anexo 1):

- 1. Transmisión continúa (activa):** Se encuentran larvas de *O. volvulus* en estadio infectivo (L₃) en la población de vectores (cabezas) y niños menores de 5 años con microfilarias en piel, nódulos y serología positiva.
- 2. Transmisión suprimida:** Ausencia de larvas de *O. volvulus* en estadio infectivo (L₃), en la población de vectores (cabezas) y en niños menores de 5 años, no se encuentran microfilarias en piel, nódulos ni serologías positivas. Todos los indicadores señalan que ya no hay transmisión en el área, pero está pendiente una recomendación del PCC al Ministerio de Salud del país, sugiriendo que se detenga el tratamiento e inicie la fase de Vigilancia Epidemiológica Postratamiento.
- 3. Transmisión interrumpida:** Después de cuidadosos análisis de los indicadores por parte del PCC, éste ha recomendado al Ministerio de Salud del respectivo país, la suspensión del tratamiento con ivermectina en el foco y dar inicio a la fase de Vigilancia Epidemiológica. El Ministerio de Salud ha aceptado la recomendación.
- 4. Transmisión eliminada:** Luego de los 3 años de Vigilancia Epidemiológica Post-Tratamiento (VEPT), se han realizado las evaluaciones indicadas para este periodo y los resultados han confirmado que la transmisión continúa interrumpida.

Esta guía fue elaborada por el PCC y OEPA, como un documento de trabajo que se centra en el período de 3 años de “Vigilancia Epidemiológica Post-tratamiento” (VEPT), necesario para distinguir y conectar las categorías No. 3 (interrumpida) y No. 4 (eliminada).

El rol del PCC

El Comité Coordinador del Programa (PCC, por sus siglas en inglés) es el comité que orienta programáticamente a OEPA y a los países involucrados, con respecto al proceso de eliminación de la Oncocercosis y a la transición de cada uno de los 13 focos de la Región, por los diferentes estados de transmisión descritos.

El PCC estará comprometido en el proceso hasta que el país presente a la OPS/OMS, la solicitud oficial de certificación (Lineamientos de la OMS, 2001). El PCC debe revisar formalmente, con OEPA y el Programa Nacional, los resultados de las evaluaciones realizadas durante el periodo de VEPT dentro de los seis meses que siguen a la realización de las mismas. Si no hay evidencia de recrudescencia, entonces el PCC emitirá por escrito su opinión favorable sobre el logro de la eliminación y, si éste fuera el último foco en el país, recomendará al gobierno que solicite a la OMS iniciar el proceso final de certificación. Sin embargo, como sucedió con la decisión de detener el tratamiento con ivermectina, previo a la implementación de la VEPT, será decisión del gobierno de cada país el aceptar o no la interpretación de los resultados de la VEPT por parte del PCC y aceptar o no sus recomendaciones con relación a la solicitud de certificación a la OPS/OMS.

Orígenes del concepto de Vigilancia Epidemiológica Postratamiento

La idea de la Vigilancia Epidemiológica Postratamiento se originó en el documento de "Certificación de la eliminación de la oncocercosis: Criterios y procedimientos" de la Organización Mundial de la Salud de 2001 en el cual se recomendaba un período de tres años llamado "Período de Pre-certificación". Este es un "período nacional" (que atañe al país y no a cada foco oncoceroso de manera individual) durante el cual la vigilancia debe establecerse para detectar cualquier posible recrudescencia de la transmisión de *O. volvulus*, después de que la medicación se haya suspendido en el país.

"Con el cese del tratamiento masivo, comenzaría un período de 3 años de pre-certificación. Al final de este período de pre-certificación se debe demostrar que, aunque la medicación haya cesado, no se ha registrado ningún caso nuevo de oncocercosis y no se han encontrado vectores infectados." (OMS, página 15)

Con base en la declaración original de la OMS, el PCC adaptó el concepto de "período de pre-certificación" nacional para que fuera aplicado a los focos en vez de a los países. Este concepto (período de vigilancia postratamiento más que período de pre-certificación) era necesario debido a la naturaleza localizada de la infección en la región de las Américas, y a la necesidad de dar seguimiento al progreso de cada foco, a través de las cuatro fases de eliminación descritas anteriormente.

Definición de la VEPT

El PCC define la Vigilancia Epidemiológica Postratamiento de la manera siguiente:

“La Vigilancia Epidemiológica Postratamiento (VEPT) es un período de 3 años que inicia inmediatamente después de la suspensión del tratamiento masivo con Mectizan. Al final de este período de tres años debe demostrarse que, aunque el tratamiento con Mectizan se haya suspendido, no hay evidencia de transmisión, con base en el procesamiento por PCR, de una muestra significativa de moscas vectoras, en busca de ADN de *O. volvulus*. Si se encontraran resultados positivos por entomología, deberá entonces realizarse una evaluación serológica en niños menores de 10 años de edad en el área endémica, a través de la técnica ELISA, utilizando antígeno para Ov-16. Los resultados positivos por serología pueden confirmarse tomando biopsias de piel y procesándolas por PCR. Si los datos indican que no hay recrudescencia de la transmisión de *Onchocerca volvulus*, entonces se puede declarar que la transmisión ha sido eliminada. Si se considerara necesario, la Vigilancia Post-eliminación (también conocida como “postendémica”) podría continuar más allá de los 3 años de VEPT, en algunos focos.

Principios de la VEPT

1. Las evaluaciones contempladas en la VEPT no deben ser un tema completamente nuevo para los programas, sino una continuación de las evaluaciones de impacto que se han realizado durante todo el proceso.
2. Los indicadores obtenidos a través de las evaluaciones del periodo VEPT deben ser comparables con las evaluaciones que se realizaron para “suspender el tratamiento”, las cuales servirían como una “línea basal para la VEPT”.
3. Si se detectara una Potencial Recrudescencia, se deberá consultar al PCC lo más rápidamente posible antes de implementar cualquier acción.
4. La respuesta a una Potencial Recrudescencia debe ser flexible de tal manera que se adapte a las dinámicas de transmisión específicas para cada foco, entre otras características.
5. También pueden solicitarse estudios adicionales que igualmente se adapten a las características del foco y a la naturaleza de los signos de esa Potencial Recrudescencia, los cuales se habrán evidenciado a través de las evaluaciones iniciales de VEPT.
6. El modelo matemático EuSIMON, cuando sea factible, debe consultarse para corroborar o predecir el surgimiento de una Potencial Recrudescencia, considerando las condiciones epidemiológicas y entomológicas del foco. Las actividades de modelación deben incluir el análisis de los resultados de la VEPT y las predicciones subsecuentes relativas al corte, las proyecciones de R_0 , la certeza estadística de múltiples corridas de simulación y el riesgo de recrudescencia lenta versus recrudescencia súbita.
7. Ante una Potencial Recrudescencia, el PCC debe hacer un análisis medido antes de tomar cualquier decisión, como por ejemplo, recomendar el restablecimiento del tratamiento masivo. Si se concluye que la Potencial Recrudescencia es real entonces, en consulta con el programa nacional, se diseñará una respuesta programática rápida.

8. La respuesta programática rápida debe incluir métodos de última generación, específicos para el foco afectado, los cuales podrían incluir control vectorial, incremento en la frecuencia de los tratamientos con Mectizan, nodulectomías y el uso de doxiciclina.
9. Debe tenerse cuidado especial con la utilización, como “evidencia” de recrudescencia, de herramientas nuevas que aun no hayan sido probadas en las Américas (en fase experimental), hasta que tales herramientas hayan sido suficientemente evaluadas y validadas para la Región.
10. En caso de que surgiera alguna duda de interpretación de cualquiera de los lineamientos establecidos en este documento, deberá consultarse al PCC y a OEPA.

Continuidad de las actividades programáticas durante el periodo VEPT

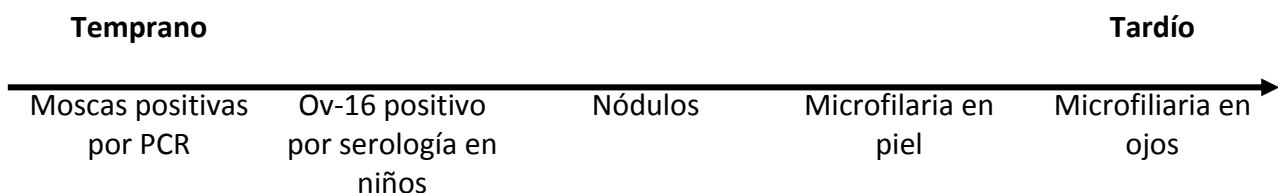
Después de la suspensión del tratamiento con Mectizan, las actividades programáticas, ahora bajo la forma de VEPT, tienen que continuar por un mínimo de tres años de acuerdo con los lineamientos de la OMS. Los ministerios de salud, los líderes políticos y donantes deben reconocer que los programas nacionales de oncocercosis no suspenderán sus operaciones programáticas de campo cuando se suspendan los tratamientos con Mectizan.

Expectativa de la evolución de la Recrudescencia

El diseño de cómo evolucionaría una Potencial Recrudencia, se basa en la historia natural de la enfermedad, la cual indica que se requieren 18 meses desde la inoculación de larvas L₃ hasta la producción y liberación de microfilarias en la piel. De esta manera, la señal más temprana de una posible recrudescencia se manifestaría en la presencia de larvas infectivas en las moscas; la siguiente señal sería el hallazgo de anticuerpos contra el antígeno Ov-16 en niños; después aparecerían los nódulos, seguidos por la aparición de microfilarias en piel y finalmente, como manifestación tardía aparecerían microfilarias en los ojos. Esto permite dividir el proceso VEPT en las etapas que se muestran en la Gráfica 1.

Por lo tanto, el enfoque más costo-efectivo, que da una señal más temprana de recrudescencia, con los menores inconvenientes para la población residente en el foco, consiste en buscar primero la positividad en los vectores, continuar con la búsqueda de anticuerpos en niños menores de 10 años de edad y, finalmente, confirmar por PCR en biopsia de piel, los resultados de los niños que fueron positivos por serología.

Gráfica 1. Expectativa de la evolución de la recrudescencia de la oncocercosis



Lineamientos básicos de la VEPT

Los lineamientos del PCC para el periodo de VEPT incluyen tres componentes:

Componente 1: Intervenciones educativas durante el periodo VEPT

Cada programa nacional debe garantizar que todas las comunidades y las personas que han estado involucradas en el proceso para eliminar la Oncocercosis, tengan pleno conocimiento sobre los procedimientos que se llevaron a cabo para demostrar que la interrupción de la transmisión se había logrado y los argumentos que sirvieron para sustentar la decisión de suspender el tratamiento con Mectizan. Adicionalmente, en conjunto con los equipos de trabajadores de salud, con los líderes y voluntarios de salud y con las comunidades, definir las actividades específicas a desarrollar durante los 3 años de VEPT, tomando como referencia las recomendaciones del PCC. Un aspecto muy importante será mantener, los lazos de comunicación permanente entre los equipos de salud, los líderes y voluntarios de salud y las comunidades a través del fortalecimiento de las actividades de promoción de la salud y mantener vivo el interés y la participación de la comunidad en el logro de la eliminación.

1.1 Actividades educativas para personal vinculado al programa

Cada programa nacional deberá garantizar que los trabajadores del programa, los equipos de salud locales y los agentes locales, líderes o voluntarios de la salud que hayan estado vinculados al programa, acompañen y estén completamente informados sobre todas las evaluaciones llevadas a cabo para demostrar que la transmisión fue interrumpida. Los resultados de estas evaluaciones deberán ser analizados conjuntamente, de tal manera que estén claros los argumentos que le permitieron al Ministerio de Salud, sustentar la decisión de suspender el tratamiento con Mectizan en las comunidades.

Los métodos a utilizar para lograr los propósitos anteriormente descritos deberán ser definidos por cada programa nacional de acuerdo con sus características y con la experiencia previamente desarrollada en el campo educativo.

1.2 Actividades educativas con las comunidades

A su vez, los trabajadores del programa, los equipos locales de salud y los líderes comunitarios o agentes locales de salud deberán explicar ampliamente, a todas las comunidades, las actividades que se llevaron a cabo, los resultados que se encontraron y los argumentos con base en los cuales se suspendió el tratamiento con Mectizan.

Las actividades educativas a utilizar en las comunidades serán definidas por cada programa nacional de acuerdo con su experiencia previa.

1.3 Acompañamiento del equipo del nivel central del programa

Cabe destacar que este aspecto es fundamental para lograr que las actividades educativas se lleven a cabo en todos los niveles descritos y logren realmente que todas las personas involucradas y las comunidades cubiertas por el programa tengan la información necesaria para entender los cambios en el quehacer del programa, especialmente la suspensión del tratamiento masivo con Mectizan. Es importante que los trabajadores del programa, los equipos de salud locales y los agentes, líderes y voluntarios de salud de las comunidades,

sientan que los coordinadores del programa en sus diferentes niveles están acompañando las actividades, identificando las necesidades y apoyando para resolver los problemas que se encuentren en el camino.

Componente 2: Evaluaciones durante la VEPT

Si la recrudescencia de la oncocercosis ocurriera durante el período VEPT, no sucedería de manera súbita (ver gráfica 1), razón por la cual el Comité Coordinador de OEPA (PCC) recomienda que los países lleven a cabo una evaluación entomológica durante el segundo y/o tercer año del período VEPT, la cual deberá realizarse durante el periodo de más alta transmisión, para confirmar que ésta permanece interrumpida y por lo tanto, ha sido eliminada.

El elemento principal del periodo VEPT serán las evaluaciones entomológicas para determinar la posible presencia de ADN del parásito en los vectores *Simulium*.

2.1 Evaluación entomológica

(Katholi 1995, Unnasch 1996, Katholi 2002)

- ♦ Se realizará una evaluación entomológica por medio de la técnica de PCR (Anexo 2)
- ♦ Se recolectará un mínimo de 10,000 moscas por foco (si las hubiera), en comunidades centinelas y/o extra-centinelas, se procesarán en pooles de hasta 50 moscas, por medio de PCR y los datos se analizarán con el programa PoolScreen para obtener la tasa de infectividad. Quizá sea necesario incluir las comunidades extra-centinelas para incrementar la representación del foco y/o la certeza estadística de que la transmisión se encuentra interrumpida.
- ♦ Tiempo: La recolección de moscas se realizará durante el periodo de más alta transmisión en cada foco, iniciando no más tarde del tercer año de VEPT y, cuando el pico de alta transmisión vaya de un año al otro (por ejemplo, de octubre a febrero), las colectas deberán iniciar al finalizar el 2º año.
- ♦ Primero se examinarán por PCR los pooles de cuerpos de las moscas y, si se encontrara uno positivo (que contenga larvas infectantes (L1 y L2)), se examinarán todos los pooles de cabezas (que podrían contener larvas en estadio infectivo [L₃]).
- ♦ Para confirmar que la transmisión permanece interrumpida y por lo tanto ha sido eliminada, se deberían obtener los siguientes resultados:
 - Una **tasa de infectividad** (infección de L₃ en cabezas) por PCR <1/1,000 (0.1%) en moscas paras o <1/2,000 (0.05%) en todas las moscas, asumiendo que el 50% de las moscas son paras. Se utilizará un intervalo de confianza (IC) de 95%.
 - Un **PTA/PTE** <20 L₃. El uso de PTA/PTE es esencial en áreas donde la densidad de picada del vector es tan baja que el IC 95% de la tasa de infectividad <1/2,000 (0.05%) no puede ser demostrado (Lindblade 2007).

2.2 Encuesta serológica

(Lobos 1991, Lipner 2006, Lindblade 2007)

- ♦ El examen para determinar anticuerpos contra el antígeno Ov-16 por medio de la técnica de ELISA, se llevará a cabo en el 3er año, sólo si el resultado de la evaluación entomológica demuestra que puede haber una recrudescencia de la transmisión (Anexo 3).

- ♦ Se examinarán 3,000 niños menores de 10 años para detectar, por medio de la técnica de ELISA, los anticuerpos específicos IgG4 contra el antígeno recombinante Ov-16.
- ♦ Los lineamientos de la OMS demandan que se demuestre una tasa de incidencia acumulativa de 5 años <0.1% y aquí consideramos la prevalencia de anticuerpos contra Ov-16 como equivalente a la tasa de incidencia acumulativa. En consecuencia, para calcular la tasa de prevalencia <0.1%, con un IC de 95%, asumiendo que no se registren positivos, se requiere una muestra de al menos 3,000 niños menores de 10 años.
- ♦ Si no existe este tamaño de muestra en el foco, entonces deberán evaluarse todos los niños en este grupo de edad que sea posible.
- ♦ El muestreo debe ser representativo de todo el foco.
- ♦ El análisis deberá permitir la estratificación por edad.

Ov-16 es un antígeno circulante durante el periodo pre patente y los anticuerpos a este antígeno indican exposición y posible infección pre-patente, es decir, una infección que apenas se está incubando y no ha alcanzado su estado más avanzado (manifiesta). Por lo tanto, si se registran niños con resultados positivos por serología a Ov16 y el valor de ese indicador es mayor que 0.1%, debe tomarse una biopsia de piel a estos niños encontrados positivos, para su análisis por PCR (para determinar la infección). Si estos niños fueran hallados negativos por medio del examen de PCR, entonces se considerarán negativos a la infección con *O. volvulus*, pero todavía podrían ser considerados como “expuestos” al parasito.

2.3 PCR en biopsia de piel de niños positivos por serología

La serología con Ov16 (por la técnica de ELISA) detecta solo la exposición al parásito, sin poder determinar el tiempo en que ésta haya ocurrido, mientras que la técnica de PCR detecta si hay o no infección por *O. volvulus*. Para este fin, las biopsias se deben conservar en etanol o isopropanol absoluto.

2.4 Discusión sobre la edad de los niños a ser evaluados por serología

Vale la pena mencionar este tema, dado que fue un punto de amplio debate en el PCC.

En los Criterios para la certificación de eliminación de la oncocercosis, la OMS establece como uno de los indicadores de interrupción de la transmisión:

“La ausencia de infección detectable (evidenciada por microfilarias, nódulos, pruebas inmunológicas u otros análisis) en niños hasta de 5 años de edad que no hayan sido tratados (Ej., aquellos que están a punto de recibir su primera dosis de Mectizan). Una tasa de incidencia acumulativa de 5 años con menos de 1 nuevo caso por 1,000 niños susceptibles es aceptable (siempre y cuando esté disponible una población de este tamaño)”.

Los lineamientos de la OMS buscaban calcular una incidencia acumulativa de <1/1,000, de tal manera que sólo los niños de hasta 5 años pueden suplir la información requerida porque cada niño de 4 años sólo tendría una incidencia de 4 años, los de 3, de 3 años, etc.

Sin embargo, desde una perspectiva operativa, en la mayoría de los países endémicos de las Américas es difícil encontrar niños menores de 5 años agrupados y fácilmente alcanzables para la toma de la muestra. Adicionalmente, a menudo los padres se muestran renuentes a dejar que los niños pequeños sean pinchados para obtener una muestra de sangre, aún si es en el dedo.

La recomendación del PCC de evaluar a niños menores de 10 años de edad cumpliría con los criterios de la OMS puesto que involucrar niños de más edad proveería mayor respaldo a la interrupción de la transmisión (ej.: cada niño de 8 años que sea negativo aporta una densidad de incidencia de 8 años a la fórmula, etc.). En segundo lugar, la serología por Ov-16 no se ve afectada por el tratamiento con Mectizan®.

Por último, la infección por oncocercosis se incrementa entre los 5 y 20 años de edad. Sin embargo, los niños >10 años de edad pueden dar una imagen falsa de la situación de la transmisión pues ellos podrían ser seropositivos por haber estado expuestos o infectados en un pasado distante, aun cuando la transmisión hubiera permanecido interrumpida en el área desde hace bastantes años. Por la misma razón, los adultos no serían un buen grupo de edad indicador para los estudios serológicos debido a la posibilidad de que tengan anticuerpos que se originaron por su exposición al parásito en épocas pre-control y que aún persisten.

2.5 Métodos complementarios para estudio de recrudescencia

Evaluación de comunidades centinela por biopsia de piel

Algunos focos han establecido comunidades centinelas en las que se han llevado a cabo una serie de evaluaciones longitudinales (programáticas) de microfilarias (mf) en piel, ojos y nódulos, al inicio y durante la fase de tratamiento del programa de eliminación. Por esta razón, el PCC recomienda que si durante el último año del período de VEPT, los resultados por PCR en los simúlidos muestran una Tasa de Infectividad $\geq 1/2,000$ y el PTA es >20 , estas comunidades centinelas sean reexaminadas por biopsias de piel (utilizando microscopio). El PCC sin embargo, no considera necesarias las evaluaciones oftalmológicas.

Búsqueda nódulos

Debido a que los nódulos subcutáneos no son específicos en áreas donde la prevalencia de la oncocercosis es baja, el PCC no recomienda la vigilancia de nódulos durante la VEPT. Si los países eligen implementar la vigilancia de nódulos, el contenido de las masas sospechosas deberá ser determinado por análisis histológico (Ej.: por extracción de las masas, corte y tinción) y el hallazgo inicial de gusanos de *O. volvulus* a través del examen microscópico deberá ser confirmado por un reconocido experto en la materia, en consulta con OEPA (Anexo 4). De manera alternativa, un método más rápido e igualmente específico podría ser la aspiración con aguja del nódulo sospechoso, para obtener fluido y procesarlo por PCR en un laboratorio apropiado, también en consulta con OEPA.

2.6 El proceso de toma de decisiones

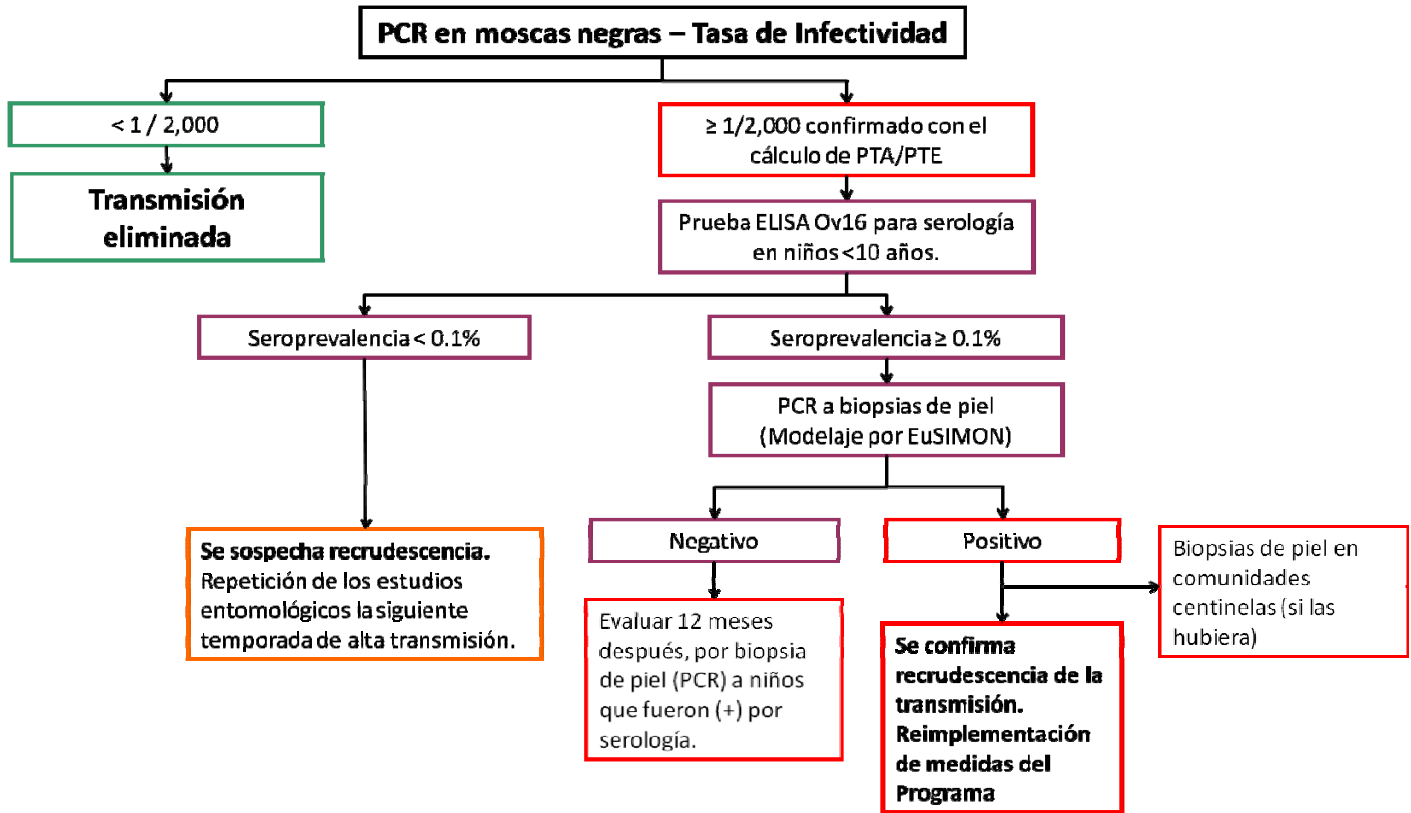
- ♦ Si en la evaluación entomológica no se encontraran pooles de cabezas positivos o si la tasa de infectividad fuera $<1/2000$ y el PTA/PTE sea <20 , se confirma que la transmisión ha sido

eliminada. Sin embargo, el Comité Coordinador de OEPA podría recomendar que se extienda la vigilancia postratamiento en algunas áreas, con base en consideraciones epidemiológicas y vectoriales particulares.

- ♦ En los casos donde haya pooles de cabezas positivos por PCR (la tasa de infectividad con un valor superior del IC de 95% $\geq 1/2,000$ (0.05%) y el PTA/PTE >20 , se realizará una encuesta serológica en una muestra de 3,000 niños menores de 10 años, que residan en el foco (si se dispone de esa cantidad de niños con esas características), con el fin de determinar seropositividad (presencia de anticuerpos específicos IgG4 contra el antígeno recombinante Ov-16, en la sangre capilar tomada a los niños).
- ♦ Si en la encuesta serológica se obtiene una prevalencia de anticuerpos $<1/1,000$ ó 0.1% (95% IC), se sospecha que una recrudescencia podría estar ocurriendo y se recomienda repetir los estudios entomológicos en la próxima temporada de alta transmisión.
- ♦ Si se obtiene una prevalencia de anticuerpos $\geq 1/1,000$ ó 0.1% (95% IC), podría estar ocurriendo una recrudescencia. Para confirmarlo, a los niños con resultados positivos se les tomará una biopsia de piel la cual se procesará por PCR.
- ♦ Si por PCR en piel se confirman los resultados que fueron positivos por serología, se considera que los niños están infectados y se confirma que está ocurriendo una recrudescencia de la transmisión. Deberá entrevistarse a la familia de los niños positivos para excluir viajes a otras áreas endémicas o eventual exposición a los vectores. Tales situaciones necesitarán ser manejadas caso por caso, en consulta con OEPA.
- ♦ El PCC recomienda adicionalmente reevaluar por biopsia de piel, las comunidades centinelas (si las hubiera). Anexo 5.
- ♦ Si los niños que fueron positivos por serología resultan negativos por PCR, serán considerados negativos a la infección activa (manifiesta) con *O. volvulus*. En este caso la recrudescencia no se confirma pero podría estar ocurriendo y por lo tanto, estos niños deberán ser examinados de nuevo 12 meses después, por medio de biopsias de piel procesadas por PCR, para confirmar su situación. Este resultado deberá considerarse definitivo.

A continuación puede verse un diagrama de flujo que ilustra el proceso de toma de decisiones descrito.

Gráfica 2. Flujograma de decisiones durante el periodo VEPT para detectar, confirmar y responder a una Potencial Recrudescencia (PR).



2.7 ¿Qué hacer ante la detección de una Potencial Recrudescencia?

Si las evidencias entomológicas y serológicas indican el surgimiento de recrudescencia en una área en particular (ver la gráfica 2), deberán entonces iniciarse las medidas apropiadas para prevenir más infecciones y, donde sea posible, eliminar el parásito o reducir los niveles por debajo del umbral de mantenimiento de la transmisión. Sin embargo, el PCC deberá ser contactado inmediatamente previo a cualquier implementación de estas medidas, para que pueda encontrarse una solución adecuada, utilizando métodos específicos de última generación. Esto podría incluir control vectorial, incremento de tratamientos con ivermectina, nodulectomías y el uso de doxiciclina.

Componente 3. Preparación de un informe a ser presentado ante la OPS/OMS como soporte de la solicitud de certificación de eliminación.

Durante el periodo VEPT, además de trabajar en los dos componentes antes descritos (Educación y Evaluaciones), el equipo del programa nacional deberá dedicar esfuerzos a la organización de los datos y preparación de este informe, el cual debe reunir los requisitos establecidos por la OMS en el apéndice II *“Directrices para la preparación de un informe de país”* de la guía de criterios para la certificación (Ginebra, 2001). Tanto la OPS como OEPA apoyarán la elaboración del mismo.

Solicitud de certificación de eliminación a la OPS/OMS, por país

Las solicitudes de certificación de la eliminación a la OPS/OMS no se podrán hacer por foco, sino únicamente por país. El PCC y OEPA ayudarán a los programas de los países en el proceso para solicitar la certificación. Cuando el último foco de un país inicie su período de VEPT, por definición (en la terminología de los lineamientos de certificación de la OMS), el país habrá entrado en el “período de pre-certificación” luego del cual, podrá presentarse a la OPS/OMS una solicitud formal de certificación.

Anexos

Anexo 1: Calendario de actividades en el proceso hacia la eliminación de la Oncocercosis

El proceso hacia la certificación de la eliminación de la oncocercosis en las Américas se detalla en el cuadro siguiente.

Fase de tratamiento	Inician los tratamientos
	<ul style="list-style-type: none"> – Evaluaciones basales y programáticas (cada cuatro años) que muestran positividad en la mayoría de indicadores (clínicos [nódulos], parasitológicos [mf], oftalmológicos [MfCA, MfC] y entomológicos [L₃])
	La transmisión continúa
	<ul style="list-style-type: none"> – Se encuentran larvas de <i>O. volvulus</i> en estadio infectivo (L₃) en la población de vectores (cabezas) y niños menores de 5 años con microfilarias en piel, nódulos y serología positiva.
	La transmisión suprimida
	<ul style="list-style-type: none"> – Las evaluaciones comienzan a mostrar resultados negativos – Se realizan evaluaciones orientadas a demostrar que la transmisión ha sido interrumpida en todo el foco.
Fase de Vigilancia Epidemiológica Postratamiento	Transmisión interrumpida
	<ul style="list-style-type: none"> – La transmisión se considera interrumpida cuando los indicadores entomológicos son negativos – Se completa la documentación para corroborar los resultados negativos. – El PCC en conjunto con representantes del programa nacional analiza toda la información epidemiológica disponible – El PCC emite una recomendación al Ministerio de Salud del país, para que detenga el tratamiento con ivermectina. – El Ministerio de Salud acepta la recomendación
	Transmisión interrumpida
	<ul style="list-style-type: none"> – El programa lleva a cabo actividades educativas en las comunidades previamente endémicas del foco, explicando los argumentos que sustentaron la decisión de suspender el tratamiento masivo con Mectizan. – Se implementa la Vigilancia Epidemiológica Postratamiento (VEPT) por un período de tres años y se llevan a cabo las evaluaciones contempladas para este periodo. – Se presentan al PCC, para su revisión, los resultados de las evaluaciones realizadas durante el periodo de VEPT. – Si los resultados lo indican, se confirma que la transmisión de la Oncocercosis ha sido eliminada – Cuando se confirma la eliminación en el último foco de un país, el PCC recomienda al gobierno que inicie el trámite de solicitud de certificación de eliminación ante la OPS/OMS. – OEPA ayuda al país en la preparación de un expediente a ser presentado ante la OPS/OMS como soporte de la solicitud de certificación de eliminación. – En una publicación revisada por pares se presentan los resultados que han llevado a detener el tratamiento.
	Transmisión eliminada
	<ul style="list-style-type: none"> – El país solicita formalmente a la OPS/OMS la certificación de la eliminación – OPS/OMS conforma un equipo internacional independiente para que revise la información en el campo – OPS/OMS otorga la certificación final (sólo a países, no a focos)
Certificación de eliminación	Certificación Final de Eliminación de la Transmisión en el País, por la OMS

Anexo 2: Evaluación Entomológica

En la preparación de la evaluación entomológica se deberán considerar diversos aspectos como la conformación de los equipos de captura (recolector y atrayente), la elaboración del cronograma de recolección de acuerdo con los periodos de más alta transmisión y la preparación de los materiales necesarios para el empaquetamiento y conservación de las moscas recolectadas.

Selección de las comunidades donde se realizará la evaluación

Las comunidades a evaluar en cada foco, serán las comunidades centinelas y extracentinelas en las cuales se realizaron las Evaluaciones Epidemiológicas en Profundidad (EEP) que permitieron determinar el impacto del tratamiento masivo con Mectizan sobre la evolución de la transmisión y al final, demostrar que la transmisión había sido interrumpida.

Selección de los sitios de recolección dentro de la comunidad

En cada una de las comunidades a evaluar, se deberán identificar los sitios donde se realizarán las capturas, que serán los mismos sitios utilizados durante las EEP.

Selección del periodo y horario de recolección

Los periodos de alta transmisión pueden variar por foco. Por ejemplo, las tasas más altas de transmisión de *O. volvulus* en Guatemala suceden anualmente entre noviembre y abril, y por lo tanto, las capturas se deben realizar durante estos meses. Adicionalmente, el mayor número de moscas paras se encuentra entre las 12 m. y 5 p.m. y, por lo tanto, las colectas se deben realizar cada día en este periodo.

El número de días de colecta dependerá de la densidad de picada que se registre en las comunidades. Así, con tasas de picada bajas, se necesitará realizar las recolecciones de moscas durante un número mayor de días para asegurar un número de moscas suficiente (alrededor de 10, 000 moscas) y así, obtener un PTA más preciso.

Procedimiento para la recolección

- Deben seguirse los métodos estándar para evaluar la tasa de picada y para recolectar los especímenes del vector. Cada equipo consiste de un recolector y un atrayente.
- Cada programa nacional ha estandarizado las horas de recolección de moscas de acuerdo con la determinación que hicieron de las horas en las cuales pica el mayor número de moscas paras (ejemplo: de 8am a 5pm, de 11am a 5pm, etc.).
- Las moscas son recolectadas durante 50 minutos de cada hora, por aspiración, antes de que tengan oportunidad de chupar sangre.
- Las moscas recolectadas se conservan en etanol absoluto, en tubos con una etiqueta que muestre la hora, la fecha, el sitio de recolección y la comunidad.
- Al final de cada día, las moscas se separan por especie, utilizando un microscopio estereoscópico.
- Las cantidades de moscas colectadas en el área se registran por hora de captura.

Análisis de laboratorio

Para el procesamiento por PCR de las moscas recolectadas, se conforman pooles (tubos o frascos) con 50 moscas como número máximo.

Las cabezas y los cuerpos de las moscas se separarán utilizando procedimientos estandarizados. Las moscas se examinarán por medio de la técnica de Reacción en Cadena a la Polimerasa (PCR) para detectar el ADN de *O. volvulus*. Primero se examinan los pooles de cuerpos y, si algunos resultan positivos, se repite el examen de estos supuestos positivos. Si se confirma que efectivamente son positivos, entonces se suspende el procesamiento de los pooles de cuerpos y se procesan todos los pooles de cabezas. Como parte del proceso para estandarizar este procedimiento, se utilizan controles positivos obtenidos de la Universidad del Sur de la Florida. Los positivos se confirman por un segundo PCR.

Análisis de datos

La media geométrica del número de vectores recolectados por hora se calculó como $\left[\exp\left(\frac{\sum \log(x+1)}{n}\right) - 1 \right] / 0.833$, donde $x+1$ es el número de moscas recolectado durante un período de 50 minutos más 1 (para evitar el logaritmo [0]), n es el número de períodos de recolección y 0.833 es el factor de conversión para convertir el período de recolección de 50 minutos en 1 hora. Esta media geométrica del número de veces que el insecto se posa en la piel por hora (lo que se aproxima a la tasa de picada, como se llamará de aquí en adelante) se calcula sobre el período de captura. La densidad de picada para este período (llamada densidad de picada estacional [DPE]) se calcula como la media geométrica de la tasa de picada por hora, multiplicada por 10 horas potenciales de picada al día y el número de días en el periodo.

El programa Poolscreen® versión 2.0 emplea modelos estadísticos para calcular la probabilidad de infección de una mosca individual a partir de un número de pooles positivos y del tamaño de los pooles, y se utilizará para calcular la proporción de moscas infectivas, con intervalos de confianza (IC) de 95%, calculados utilizando el método Bayesiano.

El potencial de transmisión estacional (PTE) se calcula como el producto del DPE, la proporción de moscas con larvas de *O. volvulus* en estadio infectivo y el número promedio de larvas infectivas por mosca (se presume que es 1 en un área de baja transmisión). El PTE puede ser igual o ligeramente menor que el potencial de transmisión anual (PTA).

Tanto el Programa para el Control de la Oncocercosis de África Occidental (OCP, por sus siglas en inglés) (Cupp 2010) como evaluaciones recientes, auspiciadas por APOC/Gates utilizan, como criterio para determinar la interrupción de la transmisión en África Occidental (Mali y Senegal) (Diawara 2009), una prevalencia de moscas infectivas (Tasa de Infectividad) <0.1% en moscas paras o una prevalencia <0.05% en todas las moscas (asumiendo una tasa de paridad de 50%). El tamaño de la muestra requerido para excluir una prevalencia de moscas infectivas de 0.05% en todas las moscas, con un intervalo de confianza de 95%, -siempre que no se encuentren moscas infectivas-, es de aproximadamente 6,000. Esta medida difiere de los criterios originales de la OMS que requerían una muestra de 10,000 moscas. En los casos en que las capturas no

alcanzaron el tamaño mínimo de muestra requerido, a pesar de recolectar durante toda la temporada de transmisión, el PTA o el PTE son críticos para evaluar la situación de la transmisión de la oncocercosis.

En septiembre de 2006, una reunión de entomólogos convocada por OEPA recomendó el uso del PTA o el PTE, aunque hubo controversia respecto al nivel en el cual ocurre la interrupción de la transmisión. Todos los entomólogos en esa reunión acordaron que un PTA >20 significaba que la transmisión continuaba y <20 , significaba que la transmisión había sido interrumpida. Sin embargo, el PTA o PTE bajo el cual la tasa de reproducción (R_0) del parásito es <1 , es decir, el umbral del potencial de transmisión que indica que se avanza hacia la erradicación de la población parasitaria, todavía debe establecerse y es probable que cambie de acuerdo con las características de las especies. En la actualidad, los cálculos de este umbral de potencial de transmisión oscilan en un rango desde 5 hasta 54 L_3 /persona/año al utilizar modelos matemáticos; desde 7.6 hasta 18 al utilizar las observaciones de campo y un rango general de 5 a 20 es considerado aceptable por la mayoría de los entomólogos.

Anexo 3: Evaluación serológica

El objetivo es medir la prevalencia de anticuerpos IgG4 contra Ov-16 (un antígeno recombinante prepatente de *O. volvulus*), en niños menores de 10 años de edad.

Para determinar la población a ser incluida en la evaluación serológica, en la Región se han aplicado dos métodos que toman como referencia diferentes universos para la selección de la muestra:

1. Incluye solo comunidades endémicas que estuvieron bajo tratamiento con Mectizan y
2. Incluye comunidades potencialmente endémicas (hayan o no tenido tratamiento)

1. Método que incluye solo comunidades endémicas, bajo tratamiento con Mectizan

- Se hace un censo de los niños menores de 10 años, en cada comunidad.
- Se elabora un listado de todas estas comunidades con el correspondiente número de niños menores de 10 años.
- Si el número total de niños en las comunidades del foco es mayor de 3,000 se seleccionará una muestra.
- Para tal fin, se tomarán como universo todas las comunidades del foco y se hará una selección aleatoria de las comunidades a ser incluidas en la muestra.

2. Método que incluye comunidades potencialmente endémicas

Este método de muestreo en escuelas fue utilizado por Lindblade (2007), en Guatemala, en focos donde inicialmente se habían identificado un gran número de comunidades como potencialmente endémicas y que posteriormente se excluyeron del tratamiento, entonces era necesario incluirlas en las evaluaciones para determinar la interrupción de la transmisión.

Identificación de Comunidades Potencialmente Endémicas (CPE).

Utilizando mapas históricos de la transmisión de la oncocercosis, debe compilarse una lista de comunidades que reúnan al menos una de las características siguientes:

- a. Evidencia de transmisión de la oncocercosis en el pasado (definida como la presencia documentada de mf en piel u ojos, u oncocercomas confirmados en al menos un residente de la comunidad);
- b. Sospecha de que hubo transmisión en el pasado (se llevó a cabo una evaluación pero no se hallaron residentes positivos); o
- c. Historia de haber estado bajo un esquema de administración masiva de tratamiento con Mectizan.

Las comunidades que llenan estos criterios son denominadas “comunidades potencialmente endémicas” (CPEs) y forman la base para seleccionar la muestra que participará en la evaluación serológica.

Si el número estimado de participantes está por debajo del mínimo estipulado de 3,000, entonces se deberán evaluar todos los niños en este grupo de edad que sea posible.

Se deben hacer esfuerzos para encontrar a los niños ausentes y asegurar la máxima participación en la evaluación.

Procedimientos

Se llevan a cabo los procedimientos de esterilización para pinchar el dedo y se absorben de 4 a 6 gotas de sangre (80-120 ul) en papel filtro Whatman No. 2.

Se dejan secar las muestras de sangre en el papel filtro, se separan con hojas de papel y luego se agrupan y almacenan en bolsas plásticas selladas que se depositarán en una hielera para ser enviadas al laboratorio, donde se guardarán a una temperatura de 4° C, siempre y cuando se vayan a procesar inmediatamente. En caso de que el procesamiento no vaya a llevarse a cabo en corto tiempo, las muestras deberán ser conservadas a -20° C.

Análisis de laboratorio

Se colocan dos trozos de 6 mm de papel filtro, saturados con sangre, en una solución PBS-Tween 0.05% y una solución tampón BSA 5% y se extrae durante la noche a una temperatura de 4° C. La extracción se corre en duplicado en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) para detectar anticuerpos IgG4 contra el antígeno recombinante Ov-16. Una curva estándar es utilizada en cada placa para identificar muestras positivas y permitir comparaciones entre placas y a lo largo de los días. Cualquier resultado positivo se procesa de nuevo, antes de ser reportado como positivo.

Anexo 4: Vigilancia de nódulos

Algunos programas han elegido llevar a cabo la vigilancia de nódulos durante la VEPT. Luego de una serie de discusiones sobre los méritos de tal vigilancia, *el PCC decidió no apoyar la vigilancia de nódulos puesto que muchas condiciones podrían ser la causa de masas subcutáneas clínicamente sospechosas de ser oncocercomas*. De este modo, fácilmente pueden resultar falsos positivos y debe tenerse cuidado de distinguir entre las siguientes categorías:

1. *“Masas”*: como las reportaría personal no entrenado o los pacientes mismos, las cuales a menudo no son sospechosas de ser oncocercomas.
2. *“Masas sospechosas”*: que semejan clínicamente oncocercomas y
3. *Oncocercomas: confirmados por análisis histológico* o por el procesamiento, por PCR, del fluido extraído con aguja.

El proceso que generalmente se ha implementado comprende:

- Actividades educativas con los equipos de salud locales y con las comunidades, para promover que reporten la aparición de cualquier masa subcutánea sospechosa de ser un nódulo oncocercoso.
- Cada “masa subcutánea” que se detecta, se documenta describiendo detalladamente sus características clínicas (tamaño, consistencia, ubicación anatómica, movilidad y si es o no dolorosa) y si la masa apareció después de que el tratamiento se suspendió.
- Tales masas son remitidas para su revisión por personal entrenado por el programa, con el fin de distinguir a las “masas” de las “masas sospechosas”.
- Las masas que se identifican como probables nódulos oncocercosos son removidas y sometidas a un examen histopatológico, en acuerdo con OEPA, con el fin de ser confirmadas.
- El patólogo que examine el tejido debe ser experimentado y en casos donde se encuentre un diagnóstico positivo, éste debe ser confirmado por un experto independiente.

La vigilancia activa de nódulos ha sido una actividad rutinaria en algunos programas (especialmente en México) y, sin duda, esta modalidad de trabajo de campo continuará durante el período de VEPT. Sin embargo, fuera de México, se asume que la búsqueda de nódulos será mayormente pasiva, por auto-reporte de masas o por examen de personal de salud que no ha tenido experiencia previa en la identificación de nódulos.

Anexo 5: Comunidades Centinelas

En su fase inicial, OEPA estableció una metodología para determinar el impacto del tratamiento masivo con Mectizan® en comunidades endémicas, que consiste en la selección de un grupo de comunidades *centinelas* que han sido sometidas a un seguimiento especial, a través de la realización de Evaluaciones Epidemiológicas en Profundidad (EEP), con una periodicidad regular. Es importante aclarar que no todos los 13 focos endémicos de la Región establecieron comunidades centinelas debido a que algunos de ellos no tenían comunidades hiperendémicos. Sin embargo, conforme se fue avanzando en el proceso hacia la eliminación se identificó la necesidad de seleccionar otras comunidades para evaluar la situación de la transmisión en áreas no evaluadas previamente. A estas comunidades se les denominó *extra-centinelas*.

- Las comunidades centinelas fueron escogidas por cada programa nacional, al inicio de sus operaciones y en la mayoría de los casos fueron escogidas hiperendémicas (prevalencia basal > de 60%). Con este mismo criterio fueron seleccionadas más tarde las extra-centinelas. Las Evaluaciones Epidemiológicas en Profundidad en las comunidades centinelas se llevan a cabo a intervalos regulares (evaluaciones programáticas de impacto); la primera, antes de iniciar el tratamiento; la segunda, al final de los dos primeros años y de allí en adelante, a intervalos de 4 años. En las extra-centinelas también se han realizado EEPs pero no se han seguido intervalos de tiempo definidos previamente.
- Las EEP incluyen indicadores parasitológicos (mf y nódulos), oftalmológicos, serológicos y entomológicos.
- Las evaluaciones entomológicas del periodo VEPT se realizan en las comunidades centinelas y extra-centinela en las cuales se realizaron evaluaciones para determinar la interrupción de la transmisión.
- El PCC recomienda que se realicen biopsias de piel en comunidades centinelas solamente en el siguiente escenario:
 - ♦ La evaluación entomológica realizada en el periodo VEPT mostró resultados positivos (TI \geq 1/2000 y PTA >20)
 - ♦ A través de la encuesta serológica se determinó una prevalencia de anticuerpos IgG4 contra *O. volvulus* >0.1% y
 - ♦ El PCR de las biopsias de piel tomadas a los niños con serología positiva, resultó positivo.

Referencias

Cupp EW, Sauerbrey M, Richards F. Elimination of human onchocerciasis: History of progress and current feasibility using ivermectin (Mectizan®) monotherapy. 2010. Acta Trop. Agosto 27. [Epub en proceso de publicación]

Diawara L, Traoré MO, Badji A, Bissan Y, Doumbia K, et al., 2009. Feasibility of onchocerciasis elimination with ivermectin treatment in endemic foci in Africa: First evidence from studies in Mali and Senegal. PLoS. Negl. Trop. Dis. 3, e497.

Katholi CR, Toe L, Merriweather A, Unnasch TR, 1995. Determining the prevalence of *Onchocerca volvulus* infection in vector populations by polymerase chain reaction screening of pools of black flies. J Infect Dis 172: 1414-7.

Katholi CR, Barker J, 2002. Poolscreen. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham.

Lindblade KA, Arana B, Zea-Flores G, Rizzo N, et al. 2007. Elimination of *Onchocerca volvulus* transmission in the Santa Rosa Focus of Guatemala American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77:334-41.

Lipner EM, Dembele N, Souleymane S, Alley WS, Prevots DR, et al. 2006. Field applicability of a rapid-format anti-Ov-16 antibody test for the assessment of onchocerciasis control measures in regions of endemicity. J Infect Dis 194: 216-21.

Lobos E, Weiss N, Karam M, Taylor HR, Ottesen EA, Nutman TB, 1991. An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen: a specific and early marker of infection. Science 251: 1603-5.

Pan American Health Organization (2008) Resolution CD48/R12. Toward the elimination of onchocerciasis (River Blindness) in the Americas. XLVIII Directing Council of the Pan American Health Organization. Washington, DC: PAHO. Disponible en: <http://www.paho.org/english/gov/cd/cd48.r12-e.pdf> Consultado el 28 de julio de 2010

Unnasch TR, Meredith SEO, 1996. The use of degenerate primers in conjunction with strain and species oligonucleotides to classify *Onchocerca volvulus*. Clapp JP, ed. Methods in Molecular Biology. Volumen 50. Species Diagnostics Protocols: PCR and Other Nucleic Acid Methods. Totowa, NJ: Humana Press, Inc., 293-303.

World Health Organization (2001). Guidelines: Certification of elimination of human onchocerciasis: criteria and procedures. Geneva (WHO/CDS/CPE/CEE/2001.18b). Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CPE_CEE_2001.18b.pdf Consultado el 28 de julio de 2010