

DETECCION Y DESCRIPCION DE LA ONCHOCERCA VOLVULUS

Dr. DAVID H. STONE, Dr. RONALD H. GUDERIAN H., Dr. J. ROBERTO
PROAÑO S., Dr. MARCO A. HERDOIZA V.

*Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador.
Departamento de Oftalmología del Hospital Vozandes de Quito, Ecuador.*

RESUMEN

La diagnóstico de la *Onchocerca volvulus* en el Ecuador se basa en la detección de la microfilaria en la piel, en la cual, para realizar la biopsia se usa un punch córneoescleral. Después de la incubación, las microfilarias que emergen son enumeradas y los resultados estandarizados. Otros métodos invasivos no son recomendados para la diagnóstico. Un nódulo palpable o la presencia de microfilarias en el ojo, en ausencia de una biopsia positiva en la piel, tienen que ser consideradas en la pauta a seguir para la diagnóstico. Futuros descubrimientos son necesarios para hacer de las pruebas serológicas un diagnóstico válido. La prueba de la reacción Mazzotti tiene que estar limitada únicamente a áreas en las cuales la biopsia de la piel es negativa y no hay evidencia de microfilaria en el tejido ocular. El gusano filaria extirpado de pacientes con oncocercosis tiene características de *Onchocerca volvulus*. (*Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 11:121, 1986).

La oncocercosis está bien establecida en poblaciones rurales de la provincia de Esmeraldas. El mayor foco está localizado en la cuenca de Santiago (formada por los ríos, Santiago, Cayapas, Onzoles, y sus afluentes), con seis focos satélites que se encuentran en los ríos Verde, Canande, Viche, Sucio, Vilsa y Cojimés (6). Cada uno de estos focos tiene sus peculiaridades epidemiológicas, con diferentes manifestaciones de la enfermedad. De un modo u otro, esta variabilidad es en parte atribuida a las diferencias en parásitos deformados o variables que aún no han sido determinadas, no obstante algunos patrones de exposición a la infección e intensidad son probablemente los determinantes mayores del cuadro clínico local.

Individuos de un área pueden desarrollar signos representativos del espectro clínico,

mientras en otras áreas no sucede así. De este modo la diagnóstico no puede ser determinada solamente sobre la base de los síntomas predominantes de la enfermedad. Ciertos componentes de los cuadros clínicos presentados, junto con la aplicación de un rango más especializado de procedimiento de diagnóstico, tiene que ser considerado para llegar a una diagnóstico. Las características parasitológicas y un sistema de detección están siendo revisados aquí, ya que son especialmente relevantes al Ecuador.

DETECCION DE MICROFILARIA

La diagnóstico definitiva de infección con *Onchocerca volvulus* está más comúnmente basada en la detección de microfilaria en las biopsias de la piel. A fin de estandarizar el procedi-

miento, el uso de alguna variedad de incisión córneoescleral es válida y conveniente. De esta forma, una biopsia con un consecuente y razonable sangrado, pesando de uno a varios miligramos puede ser removido rápidamente y sin mucha molestia. Datos de estudios epidemiológicos en el Ecuador muestran claramente que pedacitos de la región de la cresta ilíaca ofrecen la mejor oportunidad de positividad (figura 1). (7).

TECNICA DE LA BIOPSIA

Es importante el uso de un instrumento afilado y bien conservado durante y entre su uso. Si las incisiones llegan a cubrirse con desperdicios de piel o sudor o se engrasan, entonces no trabajarán bien. Las muestras tendrán que ser apretadas con pinzas y extirpadas del paciente causando dolor y obteniendo varios tamaños de muestras. Limpie la piel sobre la región de la cresta ilíaca con alcohol de 70o/o y seque frotando o permita secar al aire antes de

tomar la biopsia. Las muestras no pueden ser recogidas de áreas húmedas ni limpiadas excesivamente con fluido porque los filos cortados se desprenderán. Un exceso de alcohol podría fijar las minúsculas biopsias, eliminando microfilaria y llevando a resultados negativos falsos. La limpieza con alcohol del sitio de la muestra, sirve no solamente para remover la contaminación densa de la biopsia, la cual puede dirigir masas de bacterias en el medio ambiente, sino también, limpia enteramente los aceites superficiales y el sudor. Obtener una biopsia de la cresta ilíaca es más accesible debido a la consistencia de la piel. En individuos con severa enfermedad oncocerca en la piel, podría ser muy difícil conseguir una muestra en la cresta ilíaca y podría ser necesario conseguirla de las nalgas. De cualquier modo, en la piel desprendida en el área de las nalgas es más difícil sacar la muestra. Nuestros datos sugieren que en el hombro sobre el omóplato, las muestras son igualmente positivas como en el área de la cresta ilíaca.

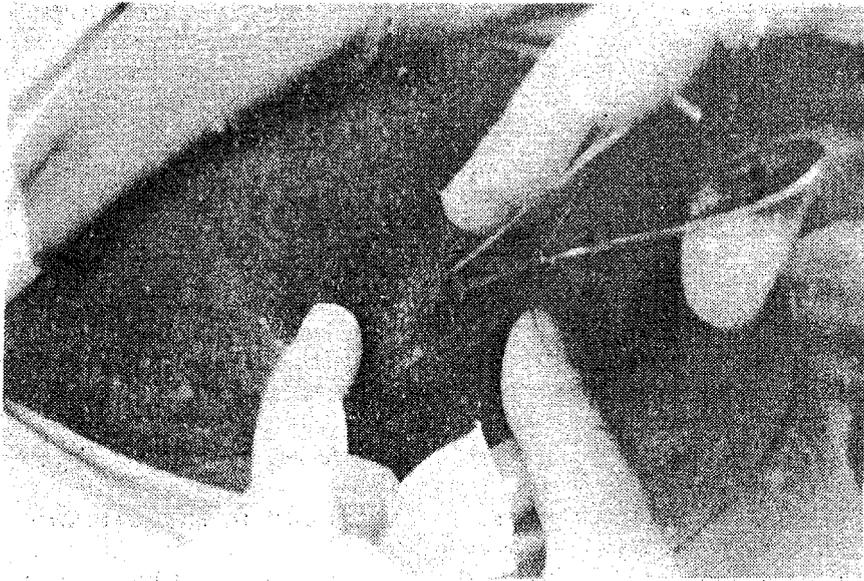


Figura 1.— Biopsia de piel de la región de la cresta ilíaca realizada con una incisión córneoescleral. La limpieza de la piel y del instrumental son esenciales para obtener resultados confiables.

EVALUACION DE LA BIOPSIA

Una vez que la biopsia ha sido obtenida, se puede usar una aguja limpia para removerla dentro de una fuente, en una bandeja microtiter (figura 2). Para la incubación se añade a cada biopsia un volumen de 100 μ l de salino fisiológico estéril (0.9o/o). En vista de que los volúmenes pequeños de fluido secan rápido, la fuente debe ser cubierta. Entre paciente y paciente el instrumento deberá ser limpiado con apósitos de algodón en alcohol al 70o/o y secado antes del uso. Si los instrumentos se esterilizan frecuentemente con formalina o al calor se corroe-rán y se deteriorarán en poco tiempo.

La microfilaria en proceso de incubación empieza a emigrar desde las muestras, en pocos minutos, en las personas seriamente afectadas, y pueden ser fácilmente contadas usando un microscopio compuesto invertido ($\times 40$). Para obtener óptimos resultados el tiempo de conteo de la microfilaria emergente ha sido estan-

darizado en 60 minutos en incubación (figura 3). Las temperaturas ambientes generalmente bastan para la incubación. Se recomienda la observación a las 24 horas en el sitio en el que el número de microfilarias es bajo. Este caso podría darse en áreas de baja intensidad y en pacientes que puedan tener severa enfermedad de la piel a causa de su reactividad hacia la microfilaria. En estas personas, podrían estar presentes pocas microfilarias. Las microfilarias frescas son larvas muy activas y esto ayuda a su detección. Para propósitos cuantitativos pueden ser enumeradas y contadas o pesadas en el área de la piel de la biopsia, aunque se necesitan balanzas analíticas para la medición exacta de estas minúsculas biopsias. No obstante, las microfilarias activas de *Onchocerca volvulus* no nadan fuera de los campos microscópicos, pero serpentean en un solo sitio. En el campo, pueden ser fijadas al final de la incubación, añadiendo 1 o 2 gotas de formalina al 10o/o a cada una para un examen posterior.

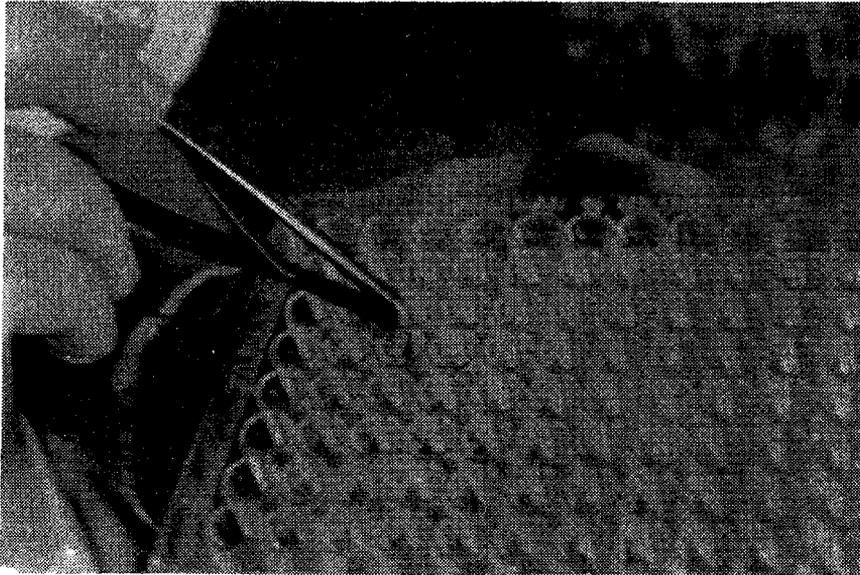


Figura 2.— Láminas microtiter con fuentes conteniendo solución salina fisiológica para la incubación de biopsia de piel usado para el diagnóstico de la oncocercosis.

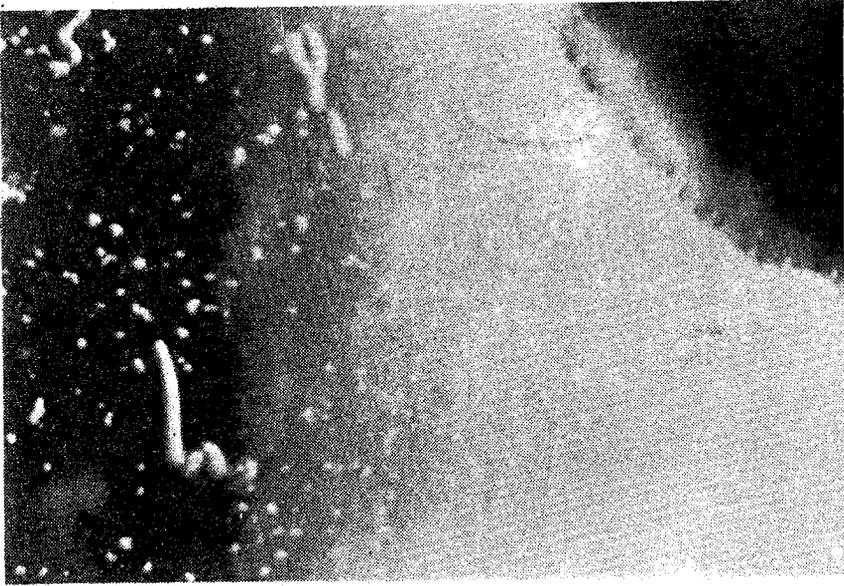


Figura 3.— *Microfilarias* emergiendo de una biopsia de piel incubada en solución salina fisiológica (x40).

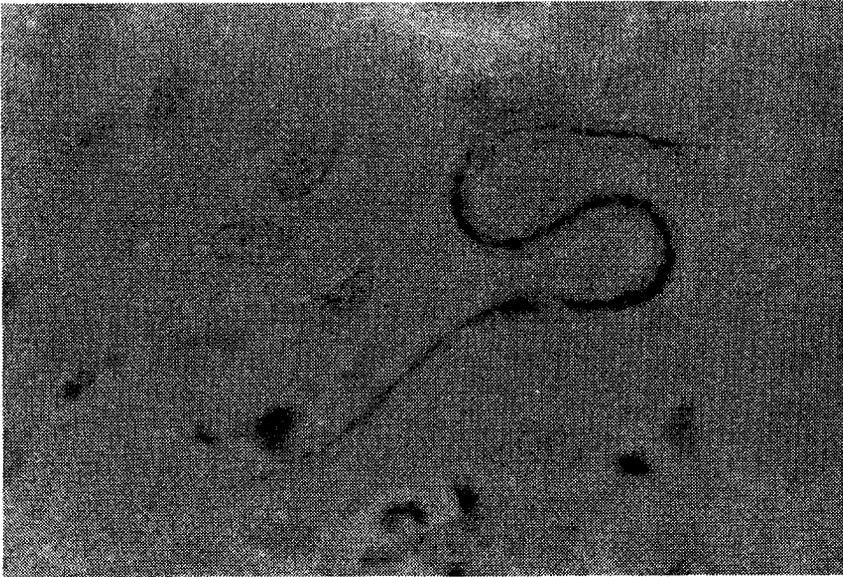


Figura 4.— *Microfilarias* de *ONCHOCERCA VOLVULUS* de un paciente de Río Cayapas, provincia de Esmeraldas.

La microfilaria característica mide cerca de 325 μm de longitud extendida y casi todo de ancho como un eritrocito (6 μm) (figura 4). En el Ecuador no es conocida otra microfilaria cutánea que pueda confundir la diagnosis.

Especímenes fijados podrían mostrar diferentes grados de disminución dependiendo de la temperatura, fijativo y tiempo. Si las biopsias son tomadas sin cuidado y la sangre contamina la biopsia, podrían resultar positivos falsos de la presencia de filaria. Esto es probable, especialmente en áreas donde *Mansonella* (antiguamente *Dipetalonema perstans*) es común, (como en Colombia) pero estas microfilarias son mucho más delgadas y pequeñas que *Onchocerca volvulus* (ie., 200 μm). *Wuchereria* puede ocurrir pero sólo ocasionalmente. En el Ecuador hemos establecido que *Onchocerca volvulus* no se encuentra en muestras de sangre (10), en contraste con algunas otras áreas en el mundo. Análogamente, las muestras de orina no son positivas para la microfilaria (8).

El sitio de la biopsia de la piel deberá ser cubierto con una pequeña venda adhesiva porque una pequeña cantidad de flujo de sangre resultará de ésta. En la raza negra podrían formarse irritaciones queloides de piel cicatrizada y son de muy mal aspecto, especialmente si se toman múltiples muestras. En Africa, han surgido serios problemas cuando las biopsias fueron tomadas de la parte anterior del ojo, causando mucho dolor y poca aceptación en los pacientes, especialmente en niños.

OTRA METODOLOGIA

En el campo, en trabajo de estudio, la rapidez y la aceptación del paciente son imperativos y el sistema descrito anteriormente funciona bien. La desventaja real es el alto costo de los instrumentos para la biopsia córneoesclearal (cerca de US\$ 300), no obstante, si estos están bien mantenidos, son durables. Las biopsias pueden ser también tomadas con una navaja de afeitar de doble hoja, usando la punta para levantar una pequeña área de piel y entonces, se extirpa con el filo de la navaja. Este procedi-

miento requiere más habilidad y es doloroso, generalmente da como resultado biopsias de varios tamaños. Investigadores anteriores han descrito la resistencia del paciente a este ensayo (13). Otros han usado "frotis" tomando directamente de las biopsias sobre platinas de microscopios y examinando después de colocado. Esto no se recomienda ni es lo experimentado en biopsias inmaduras o usando piel profunda, "raspaduras" puestas en salina bajo cubierta de vidrio. La incubación en el medio ambiente y el examen microscópico da los mejores resultados.

CRITERIO PARA DIAGNOSIS

Donde hay interés sobre la distribución del parasitismo ocular, las biopsias de piel del hombro proveen una buena indicación de probabilidad de invasión ocular de microfilaria (4). El examen oftalmológico directo con una lámpara de ranura confirmará la infección con microfilaria en la cámara anterior de la córnea, en la ausencia de biopsias positivas de piel. Esto puede ser una importante ayuda para el diagnóstico. Las microfilarias probablemente invaden el segmento posterior del ojo pero no son normalmente visibles.

En áreas endémicas una proporción de individuos tendrán nódulos palpables pero no microfilarias detectables (nódulos que contienen únicamente lombrices hembras no fertilizadas). Donde los síntomas e historia clínica son claramente compatibles con oncocercosis, con o sin nódulos palpables, el diagnóstico no puede ser rechazado en base a la ausencia de microfilaria. Por otro lado, en áreas endémicas particulares con zonas densamente positivas, pueden ser vistos aquellos que son enteramente asintomáticos, siendo presumiblemente no reactivos a su carga parasitaria. De este modo para obtener la proporción máxima de infección, en un foco endémico, todo lo siguiente tiene que ser considerado para llegar a una diagnosis de la oncocercosis: biopsia de piel positiva por microfilaria; microfilaria en la cámara anterior de la córnea del ojo en ausencia de biopsia positiva de piel.

PRUEBAS INMUNOLOGICAS

Las microfilarias no podrían ser detectadas en las biopsias de piel en individuos claramente infectados o en quienes son activamente eliminadas las microfilarias de su piel. No son detectables en infecciones ya manifestadas en las que los adultos no han producido todavía suficiente descendencia que se infiltre extensamente en el tejido de la piel. A causa de esta omisión hay entusiasmo para desarrollar las pruebas de diagnóstico inmunológico para oncocercosis. De cualquier modo, los medios sin practicidad de las detecciones inmunológicas son todavía aprovechables y las pruebas basadas en la extracción de sangre venosa podrían ser más problemáticas que aquellas basadas en biopsias de piel a causa de la resistencia del paciente.

Pruebas serológicas que detectan respuestas de anticuerpos antígenos de *Onchocerca volvulus* están plagadas de problemas de reactividad cruzada con antígenos y otros nemátodos. Intentos de usar el sistema ELISA, envolviendo extractos de antígeno crudo de *Onchocerca volvulus*, han mostrado un alto grado de reactividad pero los resultados han limitado el valor del diagnóstico porque muchos residentes asintomáticos fueron seropositivos. Mejores y más específicas preparaciones antigénicas se necesitan antes que puedan realizarse más avances.

Se necesitan también reactivos más específicos para el desarrollo de pruebas basadas en la detección de antígenos *Onchocerca volvulus* en cuerpos fluidos. Se conoce que los productos antígenos de la lombriz circulante puede aparecer en la orina, pero pasará algún tiempo antes de que las pruebas prácticas sean válidas para este propósito.

No obstante, reacciones inmediatas y de hipersensibilidad retardada al *Onchocerca volvulus* pueden ser demostradas en pacientes, a estas pruebas también les falta especificidad y no han logrado el estado de practicidad para propósito de diagnóstico.

SISTEMA MAZZOTTI Y REACCIONES CUTANEAS

Hace 40 años Mazzotti describió las curiosas reacciones de tipo alérgico en pacientes con oncocercosis a quienes se les había suministrado dosis orales de diethylcarbamazine (DEC). El propuso que esta reacción podría ser usada en diagnóstico en una prueba provocada (12) en pacientes en quienes se sospechara que tenían *Onchocerca volvulus* y en quienes fuera difícil encontrar microfilarias en muestras de piel. De cualquier modo en los años intermedios ha llegado a ser más evidente que el DEC, no sólo inicia este síndrome sistemático, sino que el mismo es peligroso y arriesgado, pero también causa efectos adversos en la retina y puede perjudicar la visión, a veces de un modo irreversible (1). Desde aquí la prueba de Mazzotti deberá ser utilizada únicamente en áreas en las cuales las biopsias múltiples de piel son negativas de microfilarias y no existe evidencia de microfilaria en la cámara anterior o córnea del ojo.

En un intento por mantener la prueba inducida como válida para el diagnóstico, ha crecido el interés en la aplicación local del DEC. La administración transcutánea del DEC. Una vez propuesta como alternativa significativa de la terapia, se conoce hoy, la causa de las intensas reacciones locales en personas infectadas con *Onchocerca volvulus* (14). El uso de DEC en forma de crema en un parche, como prueba de diagnóstico, ha sido probada en el Ecuador (9). Las reacciones ocurridas podrían ser reconocidas en horas o días, dependiendo de la severidad de las mismas. No todos estos individuos con biopsias de piel de microfilaria positiva dieron reacciones positivas al DEC. Personas con una densidad de microfilaria menor que 12 mf/mg dieron consecuentemente, una prueba de parche negativa. Esta prueba no fue tan sensitiva como el método de la biopsia. El procedimiento podría ser de valor en el seguimiento en los casos de diagnóstico problemático, casos en los que probablemente existirá una alta densidad de microfiliarias y donde los signos clínicos son evidentes.

DETECCION DE NODULOS

La diagnosis de la infección de *Onchocerca volvulus* mediante palpación manual de los nódulos granulomatosos subcutáneos, que contienen lombrices adultas ha sido el estandar aproximado y que data de las investigaciones prematuras de Bryant (2) hace medio siglo. En el Ecuador la mayor parte de los nódulos aparecen en la región de la cresta ilíaca (figura 5) y ésta es el área más ampliamente examinada. Los nódulos pueden aparecer en cualquier sitio, pero con menor frecuencia en todos los focos endémicos ecuatorianos. La clave de la detección exitosa es la palpación profunda y cuidadosa, especialmente en la cresta ilíaca, cóxis y regiones trocánteras. Es preferible el examen del paciente en dos posiciones, parado y acostado. Los diminutos nódulos no más grandes que una alverja, pueden ser detectados falsamente por lo que se necesita alguna habilidad y experiencia. Nódulos pequenitos en las cabezas de

los niños pueden encontrarse ocasionalmente (figura 6) pero en los adultos son difíciles de detectar a causa del denso crecimiento del cabello.

A causa de la sospecha de que muchos nódulos no son palpables debido a su localización profunda en los planos aponeuróticos intermusculares (3), la detección de nódulos como una ayuda para el diagnóstico ha sido válidamente cuestionada. Una minoría (29o/o) de individuos con microfilaria positiva padecen de nódulos palpables.

En vista de la necesidad de mayor objetividad, de la detección de nódulos por medios no invasivos, la técnica de ultrasonido ha sido mostrada como exitosa localizando nódulos en tejidos suaves de la región pélvica, huesos largos y caja torácica en pacientes con oncocercosis (11). El procedimiento puede ser usado para una localización más exacta y para la enumeración de las lesiones con contenido parasitario anteriores a la extirpación quirúrgica o

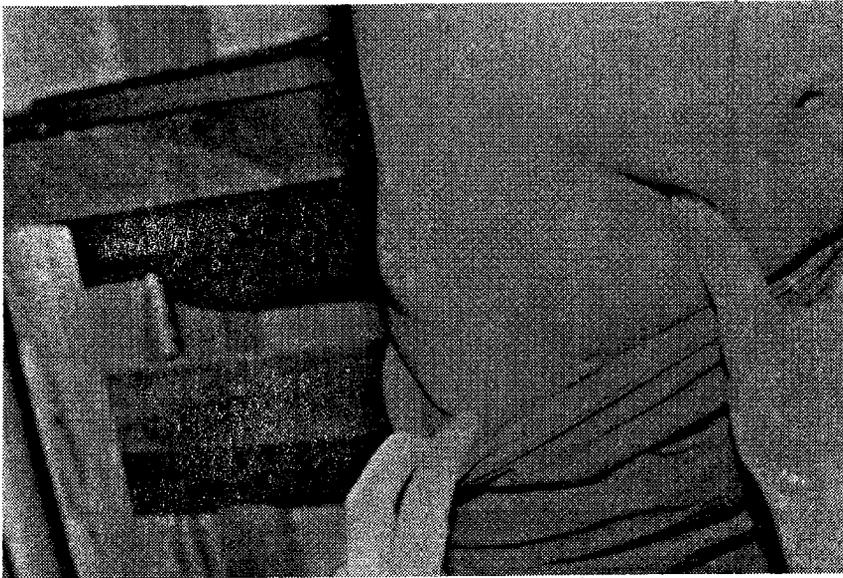


Figura 5.— Nódulo oncocercal de la región de la cresta ilíaca en un paciente con oncocercosis del Río Cayapas, provincia de Esmeraldas.



Figura 6.— Nódulo oncocercal en la frente de un paciente con oncocercosis del Río Cayapas, provincia de Esmeraldas.

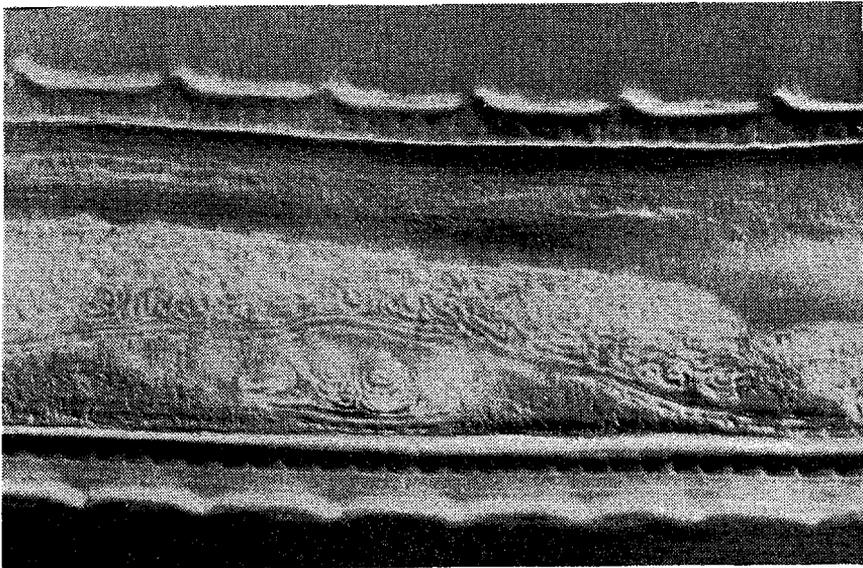


Figura 7.— Superficie característica de una lombriz *ONCHOCERCA VOLVULUS* femenina de un paciente ecuatoriano, mostrando los anillos cuticulares.

quimioterapia y podría proveer una útil evaluación para el tratamiento posterior. Una definición más precisa de la distribución de nódulos en pacientes en diferentes focos endémicos podría revelar patrones de conducta biológica de las lombrices, distinta de aquellas basadas en la técnica manual. No es increíble que los instrumentos portátiles, de alta resolución, incrementen la validez para propósitos de diagnóstico no invasivo, esto podría volverse un procedimiento práctico en el futuro.

ONCHOCERCA VOLVULUS ADULTA

La detección de un nódulo sospechoso requiere de procedimientos confirmatorios que demuestren el vínculo de las lombrices adultas dentro de las masas fibrosas. Las lombrices adultas están normalmente atrapadas en tejido granulomatoso, mucho del cual, eventualmente, se llega a formar en las fibras densas del nódulo. En fragmentos de lombrices podría ser evidente que engrosan en la sección del nódulo, y en nódulos jóvenes se desarrolla una larga extensión o aún algunas veces las lombrices enteras podrían ser removidas manualmente. En nódulos más maduros y más firmes, la asimilación de tejidos con colágeno podría presentarse a fin de liberar a lombrices enteras, aunque esto no tiene significado para el diagnóstico.

En Ecuador, las lombrices hembras generalmente miden de 20 a 50 cms. de longitud por 325 a 400 um. de ancho. La cutícula con los anillos característicos es la prueba de la presencia de la *Onchocerca volvulus* (figura 7). Las masculinas miden generalmente de 2 a 5 cms. de longitud y son mucho más activas que las femeninas y podrían emerger enteras, aún desde superficies cortadas de nódulos frescos.

Las especies de *Onchocerca* pueden ser diferenciadas en base a anillos cuticulares y las distancias entre canales, pero la infección en seres humanos con *Onchocerca* de especies animales es rara (5), y la diferenciación morfológica probablemente no sea requerida para diagnóstico. En nódulos más viejos, duros o aún calcificados, únicamente fragmentos rotos de lom-

brices podrían ser aprovechados para conformar el diagnóstico. Esto puede ser realizado microscópicamente en tejidos fijados con formalina o en fragmentos de lombrices. Otros métodos y comparaciones isoenzimáticas han sido hechas en *Onchocerca volvulus* procedente del foco del río Cayapas, y hay indicaciones de que las lombrices en el Ecuador son tan similares a las de Africa (Sudán) como a las encontradas en Guatemala (observaciones no publicadas).

DESARROLLO FUTURO Y NECESIDADES

Los métodos de diagnóstico aplicables a las circunstancias en el Ecuador, determinarán probablemente avances en unos pocos años más como inmunoagentes de especificidad incrementada. Esto podría hacer posible la detección de la infección usando por ejemplo, pruebas de anticuerpos monoclonales para antígenos *Onchocerca volvulus* en cuerpos fluidos como el suero, orina y lágrimas o incluso en la cantidad de antígenos microfilariales en material de biopsia. Variedades específicas prueban que podría demostrarse el valor en la detección del estado de larvas en vectores *Simulium* spp., y esto podría ser aplicado en la transmisión de programas de control como un indicativo de su efectividad. Los avances biotecnológicos modernos en las áreas de las variedades específicas de DNA probarían también que son aplicables en las infecciones de vector, detectando el *Onchocerca volvulus* en muestras de biopsias y quizá lo más importante; determinando relaciones genéticas entre la *Onchocerca* de cada uno de los focos endémicos del Ecuador. Al momento, de cualquier modo, la aplicación cuidadosa de métodos convencionales en la evaluación sistemática de casos sospechosos deberá permitir al clínico lograr una diagnosis en la mayoría de los casos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bird, A.C., El Sheikh, H., Anderson, J., Fuglsang, H.: Changes in visual function in the posterior segment of the eye during the treatment of onchocerciasis with DEC citrate. *British Journal of Ophthalmology*. 64: 191, 1980.

2. Bryant, J.: Endemic retino-choroiditis in the Anglo-Egyptian Sudan, and its possible relation to *Onchocerca volvulus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 523, 1935.
3. Duke, B.O.L.: Onchocerciasis: Deep worm bundles close to hip joints. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 64: 791, 1970.
4. El Sheikh, H., Ghalal, I., O'Day, J., Mackenzie, C. D.: Ocular onchocerciasis in Sudan. *Sudan Medical Journal*. 21: 33, 1985.
5. Engelkirk, P., Williams, J.F., Schmidt, G.M., Leid, R.W.: Zoonotic Onchocerciasis. In: Handbook Series in Zoonoses, J.H. Steele and M.G. Schltz (Eds.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida., pp. 225-250.
6. Guderian, R.H., Molea, J., Swanson, D., Proaño S. R., Carrillo, D. R., Swanson, W.L.: La Oncocercosis en el Ecuador: I. Prevalencia y distribución en la provincia de Esmeraldas. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*. 8: 39, 1983.
7. Guderian, R.H., Swanson, D., Carrillo, D. R., Proaño, S. R., Molea, J., Swanson, W.L.: La Oncocercosis en el Ecuador: II. Epidemiología de los focos endémicos en la provincia de Esmeraldas. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*. 8: 131, 1983.
8. Guderian, R.H., Molea, J., Carrillo, D. R., Proaño, S. R., Swanson, W.L.: La Oncocercosis en el Ecuador: III. Manifestaciones clínicas de la enfermedad en la provincia de Esmeraldas. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*. 9: 9, 1984.
9. Guderian, R.H., Proaño, S. R., Mackenzie, C.D., Herdoiza, V., M.: La aplicación de una prueba dermoreactiva, simple y segura para la oncocercosis. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 11: 9, 1986.
10. Guderian, R.H., Mackenzie, C.D., Proaño, S. R.: Onchocerciasis in Ecuador: Absence of microfilaraemia. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. In Press, 1987.
11. Homeida, M.A., Mackenzie, C.D., Williams, J.F., Ghalib, H.W.: The detection of onchocercal nodules by ultrasound technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 80: 570, 1986.
12. Mazzotti, L.: Posibilidad de utilizar como medio diagnóstico auxiliar en la oncocercosis las reacciones alérgicas consecuencia a la administración del 'Hetrazan'. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 9: 235, 1948.
13. Morgan, H.V.: Onchocerciasis in the northern Sudan. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61: 145, 1958.
14. Stingl, P., Ross, M., Gibson, D.W., Ribas, J., Conner, D.H.: A diagnostic "patch test" for onchocerciasis using topical diethylcarbamazine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 78: 254, 1984.