

**Aseguramiento externo de la calidad**

## **Manual de laboratorio y SOP**

**Métodos de laboratorio para la eliminación de la oncocercosis**

**Versión: mayo de 2023**

### **Colaboradores**

Thomas R. Unnasch

Hassan K. Hassan

### **Revisado y editado**

Vitaliano Cama

### **Apoyo financiero**

The Carter Center

Programa de donación de Mectizán

NOTA: estos protocolos se actualizarán periódicamente. Las versiones más recientes se pueden encontrar en <https://health.usf.edu/publichealth/onchocerciasis>

## Índice

<b>Laboratory Handbook and SOPs</b> .....	1
Acronyms .....	3
1. List of SOP .....	5
1. USF-002 Ov16 ELISA Protocol (OEPA Version)– Detection of antibodies against <i>O. volvulus</i> .....	6
2. USF-003 DNA extraction from <i>Simulium</i> black flies to detect <i>Onchocerca volvulus</i> .....	15
3. USF-004 Endpoint O-150 PCR Amplification of <i>Onchocerca volvulus</i> DNA.....	15
4. USF-005 ELISA based detection of O-150 PCR products .....	15
5. USF-006 <i>E. coli</i> ELISA Protocol – Detection of Antibodies for Sample Acceptance.....	17

## Acrónimos

CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)
DBS	Manchas de sangre seca (Dry blood spots)
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
EC	Control Externo (External Control)
EQA	Aseguramiento Externo de la Calidad
EQAL	Laboratorio Externo de Evaluación de la Calidad
IC	Control Interno (Internal Control)
IQC	Control de calidad interno (Internal Quality Control)
MDA	Administración masiva con Ivermectina
MDP	Programa de donación de Mectizán
Moh	Ministerio de Salud (Ministry of Health)
NEC	Control negativo de extracción (Negative extraction control)
NTC	Control negativo de plantilla (Negative template control)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PEC	Control positivo de extracción (Positive extraction control)
EPP	Equipo de protección personal
PTC	Control positivo de plantilla (Positive template control)
QA	Aseguramiento de la calidad (Quality Assurance)
QC	Control de calidad (Quality Control)
QI	Mejora de la calidad (Quality improvement)
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
SME	Experto en la materia (Subject matter expert)
SOP	Procedimiento operativo estándar (Standard Operating Procedure)
USF	Universidad del Sur de Florida (University of South Florida)

USFCC            Centro Colaborador de la OMS de la USF para el diagnóstico de la oncocercosis  
(USF WHO Collaborating Center for Onchocerciasis Diagnostics)

OD                Densidad óptica (optical density)

OMS              Organización Mundial de la Salud

## Lista de SOP

1. USF-002      Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra *O. volvulus*
2. USF-003      Extracción de ADN de moscas negras *Simulium* para detectar *Onchocerca volvulus*
3. USF-004      Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de *Onchocerca volvulus*
4. USF-005      Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150
5. USF-006      *Protocolo de ELISA para E. coli* – Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras

1. USF-002 Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) –  
Detección de anticuerpos contra *O. volvulus*

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 1 de</b> 14

## 1. Propósito

Este documento describe la detección de anticuerpos contra *Onchocerca volvulus* en muestras de sangre seca recolectadas de niños menores de 15 años. La determinación de si una muestra es positiva se basa en la prueba de ELISA.

## 2. Alcance

Este procedimiento se aplica a los laboratorios que pertenecen a la Red de Diagnóstico de Laboratorios de Oncocercosis gestionada por el Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la Universidad del Sur de Florida (USF).

La prevalencia de anticuerpos contra el Ov16 en niños de 5 a 10 años de edad es uno de los dos parámetros utilizados por la OMS para determinar si se ha suprimido la transmisión y, por lo tanto, se pueden suspender los tratamientos. Esta es también una métrica complementaria recomendada por la OMS para la verificación de la eliminación si se detecta alguna evidencia de transmisión en curso en las encuestas entomológicas posteriores a la administración masiva con Ivermectina (MDA). El Ov16 es un antígeno de 16 kDa que se encuentra en todas las etapas del ciclo de vida del parásito *Onchocerca volvulus*. Los anticuerpos de la clase IgG4 contra este antígeno han sido un indicador muy específico de la exposición al parásito. Este protocolo de ELISA es el utilizado con éxito por los países de América Latina que han verificado la eliminación de la oncocercosis. También es muy utilizado en África.

Si este protocolo se va a ejecutar en un laboratorio que también está ejecutando el ELISA de PCR de O150 para detectar la presencia de vectores L3 de *O. volvulus*, el Ov16 por ELISA debe realizarse en el área post PCR donde se encuentra el lector de placas de ELISA. Pipetas post PCR se pueden compartir entre el PCR ELISA y este protocolo ELISA. Sin embargo, es importante que NO trabaje en el área de pre PCR/PCR después de haber realizado un Ov16 por ELISA, ya que se correrá el riesgo de contaminación al pasar del área de post PCR al área de pre PCR/PCR, como se comenta en el protocolo de ELISA de PCR de O150.

Para que los resultados de este ensayo sean válidos, las muestras de gotas de sangre seca (DBS) que se hayan recogido deben contener anticuerpos activos. Los anticuerpos en las DBS son estables durante períodos relativamente largos (por ejemplo, días) a

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-002	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 2 de 14

temperatura ambiente, pero son muy susceptibles a la degradación si no se mantienen completamente secos. Por lo tanto, antes de comenzar el análisis de las DBS para los anticuerpos Ov16, es necesario determinar si las DBS aún contiene anticuerpos activos. Para ello, primero se analiza una selección aleatoria de DBS para detectar la presencia de anticuerpos contra la *Escherichia coli*. Consulte el protocolo adjunto para saber cómo hacerlo.

### 3. Documentos relacionados

Título	Número de control del documento
Manual de aseguramiento externo de la calidad	USF-001
Protocolo de ELISA para E. coli – <i>Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</i>	USF-006

### 4. Responsabilidad

Cargo	Tareas
Personal de pruebas de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las políticas y procedimientos del laboratorio</li> <li>• Leer y comprender el protocolo</li> <li>• Realizar pruebas de acuerdo con el protocolo</li> <li>• Registrar los resultados según el protocolo</li> </ul>
Supervisor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollar e implementar políticas, procesos y procedimientos para garantizar que todas las funciones críticas del laboratorio se lleven a cabo en condiciones controladas</li> <li>• Asegurarse de que todo el personal de pruebas esté capacitado y tenga los conocimientos necesarios</li> <li>• Revisar y aprobar los resultados</li> </ul>

### 5. Definiciones

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 3 de</b> 14

USF: Universidad del Sur de Florida

MDP: Programa de donación de Mectizán

USFCC: Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF

## 6. Equipo/Materiales (si corresponde)

Artículo
Congelador de -70 °C
Congelador de -20 °C
Refrigerador a 4 °C
Lector de placas de ELISA capaz de leer a 405 nm
balanza de carga superior con una exactitud de 10 mg
Balanza analítica con una precisión de 0.1 mg
Medidor de pH
Mezclador de vórtice
Placa de agitación magnética y agitadores
Micropipetas ajustables de 1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl
Micropipeta multicanal de 20-200 µl (8 ó 12 canales)
Frascos rociadores tamaño 500 ml
Perforadoras de 1/4 de pulgada

## 7. Reactivos y suministros

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Guantes de látex o nitrilo	Cualquiera	
Puntas de barrera contra aerosoles (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Cualquiera	
Selladores de placas	Cualquiera o Fisher	3501
Bolsas de plástico con cierre hermético de un litro	Cualquiera	
Placas de poliestireno de 96 pocillos para elución de DBS	Cualquiera o Fisher	3370
Placas de fondo plano Immunolon 2HB	Fisher	3455
Toallas de papel	Cualquiera (local)	
Depósitos de reactivos de 50 ml	Cualquiera	

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 4 de 14</b>

Tampón de recubrimiento	Preparado en el laboratorio	
Antígeno Ov16-GST	USFCC	
Antígeno GST	USFCC	
Anticuerpo monoclonal Ov16 IgG4 humanizado (MCAB)	BioRad	
Anticuerpo anti-IgG <sub>4</sub> humana conjugado con biotina	Sigma Invitrogen	Sigma B3648 Invitrogen A10663
Solución salina tamponada con fosfato (PBS)	Preparado en el laboratorio	
PBST	Preparado en el laboratorio	
PBST-BSA	Preparado en el laboratorio	
Conjugado estreptavidina-AP	Fisher	434322
Kit de sustrato y tampón pNPP	Fisher	37620
Cloruro de sodio (NaCl)	Cualquiera	
Cloruro de potasio (KCl)	Cualquiera	
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Cualquiera	
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Cualquiera	
Preadolescente 20	Cualquiera	
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )		
Albúmina sérica bovina, fracción V (BSA)	Cualquiera o Genesee	2Génesis 5-529
Hidróxido de sodio (NaOH)	Cualquiera (obtenido localmente)	
Solución quelante	Preparada en el laboratorio	

## 8. Suministros, otros materiales

Artículo
Agua destilada

## 9. Precauciones de seguridad

- 9.1. Los procedimientos deben realizarse de conformidad con todas las políticas y procedimientos de seguridad institucionales, de acuerdo con Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.ª Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.ª Edición | Portal de laboratorio de los CDC | CDC](#)).

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 5 de 14</b>

- 9.2. **Equipo de protección personal:** se debe usar protección para los ojos, guantes y bata de laboratorio en todo momento.
- 9.3. **Requisitos de contención:** se aplican precauciones universales.
- 9.4. **Respuesta a derrames:** N/C
10. **Obtención, almacenamiento, conservación y transporte de muestras** Las muestras serán manchas de sangre seca, separadas individualmente, almacenadas en bolsas de plástico con desecante de sílice y un indicador de color de humedad.
- 10.1. Todos los lotes de DBS que se vayan a probar deben cumplir con los criterios de la prueba de aceptación:
- 10.2. Embalaje adecuado
- 10.3. Debidamente identificado con una hoja de cálculo adjunta para identificar todas las muestras.
- 10.4. Pasar la prueba de detección del lote de *E. coli*
11. **Registro de la muestra** El laboratorio de pruebas introduce la información del lote en un documento maestro de Excel "Ov16 ELISA". A cada lote de muestras se le asignará un identificador único que permite el seguimiento de muestras y lotes.
12. **Control de calidad**  
Controles positivos y negativos según lo dispuesto por la USFCC
13. **Flujo de trabajo o tabla de procesos (opcional)**
- 13.1. Indicar los números de edificio y sala donde se procesarán las muestras y, se leerá el ELISA.
- 13.2. Indicar los números de edificio y habitación donde se ubicarán los congeladores.
14. **Procedimiento**
- 14.1.

<b>Paso</b>	<b>Acción</b>
<b>1</b>	Preparar un mapa de placas utilizando la siguiente plantilla:

STD 640	STD 640	Blanco	Blanco	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31
STD 320	STD 320	Blanco	Blanco	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32
STD 160	STD 160	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
STD 80	STD 80	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
STD 40	STD 40	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
STD 20	STD 20	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
STD 10	STD 10	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
STD 5	STD 5	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-002	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 6 de 14

STD = patrones

Blanco = pozos con PBST 5 % BSA añadido en lugar de sangre eluida

S1-S38= Muestras de sangre eluida de las DBS (por duplicado)

#### 14.2 Fabricación y elución de punzones DBS

Paso	Acción
<b>1</b>	Perfore las manchas duplicadas de las muestras de sangre seca obtenidas en los papeles de filtro con una perforadora de papel estándar de 6 mm. Usando su mapa, coloque los punzones duplicados de las manchas de sangre en los pozos de muestra de una placa de elución de DBS. Añada 200 µl de PBST-BSA a cada muestra. Empuje los punzones hasta el fondo del pozo y luego mezcle 10 veces pipeteando. Cubra las placas con un sellador de placas e incube a 4 °C durante la noche.
<b>2</b>	Almacene las muestras de sangre eluidas a corto plazo (hasta dos semanas) a 4 °C y a largo plazo a -20 °C. Minimice el número de ciclos de congelación y descongelación.
<b>3</b>	Placa de recubrimiento con antígeno: diluya el antígeno Ov16-GST a 2.0 µg/ml en tampón de recubrimiento. Agregue 100 µl a cada pozo de una placa Immunolon 2HB. Coloque el plato en una bolsa con cierre hermético e incube durante la noche a las 4 °C.
<b>4</b>	Lave 4 veces con PBST, usando una botella con atomizador. No seque entre lavados. Seque la placa en una pila de toallas de papel después del último lavado.
<b>5</b>	Agregue 100 µl de PBST-BSA, coloque la placa en una bolsa con cierre hermético e incube a 4 °C durante al menos 1 hora.
<b>6</b>	Durante la incubación del paso 4, prepare 250 µl de 250 ng/ml de McAb en PBST-5% BSA. Esto equivale a 640 unidades (por 50 µl). Prepare una serie de siete diluciones dobles del McAb. Comience con 125 µl de la calda de 250 ng/ml y agréguela a 125 µ de PBST-5% BSA. Esta será una solución de 125 ng/ml o 320 unidades/50 µl. Continúe haciendo las diluciones adicionales hasta que tenga un total de 8 diluciones en la serie, que oscilarán entre 640 unidades/50

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 7 de</b> 14

	<p>µl y 5 unidades/50 µl. Reserve 250 µl de PBST-5% BSA para usar como blanco.</p>
<b>7</b>	<p>Después de la incubación del paso 4, vacíe el PBST-BSA en el fregadero y seque la placa en una pila de toallas de papel. No enjuague.</p>
<b>8</b>	<p>Usando el mapa (descrito en 14.1), agregue 50 µl de cada muestra de sangre (dilución de control positivo, blancos y muestras eluidas) a los pozos correspondientes en el mapa de placas. Coloque el plato en una bolsa con cierre hermético e incube a temperatura ambiente durante 2 horas.</p>
<b>9</b>	<p>Enjuague 4 veces con PBST, usando una botella con atomizador. Seque la placa después del primer enjuague, luego realice los tres enjuagues restantes sin secar la placa entre los pasos de enjuague. Seque el plato después del cuarto enjuague.</p>
<b>10</b>	<p>10 minutos antes de que se acabe el tiempo para la última incubación, prepare el conjugado. Diluya el anticuerpo anti-IgG<sub>4</sub> humano conjugado con biotina en proporción 1:1,000 en PBST. Si se utiliza Sigma IgG<sub>4</sub>, diluya en proporción 1:10,000. Añada 50µl del conjugado diluido a todos los pozos. Para una placa completa, necesitará 5.5 ml de solución de trabajo. Coloque el plato en una bolsa con cierre hermético e incube a temperatura ambiente durante 1 hora.</p>
<b>11</b>	<p>Enjuague 4 veces con PBST, usando una botella con atomizador. No seque entre lavados. Pero seque la placa después del último enjuague.</p>
<b>12</b>	<p>10 minutos antes de que se acabe el tiempo para la última incubación, prepare la estreptavidina-AP. Estreptavidina-AP diluida en proporción 1:2,000 en PBST. Para una placa, agregue 2.75 µl de estreptavidina-AP a 5.5 ml de PBST. Añada 50 µl a todos los pozos. Cubra la placa e incube a temperatura ambiente durante 1 hora.</p>

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 8 de</b> 14

<b>13</b>	Enjuague 4 veces con PBST, usando una botella de lavado. No seque entre enjuagues. Seque la placa después del último enjuague.
<b>14</b>	5 minutos antes de que finalice el período de incubación, encienda el lector de placas de ELISA y configúrelo para que lea a 405 nm. Prepare la solución de pNPP con el tampón de sustrato disolviendo 1 tableta en 5 ml de tampón de sustrato 1X. Añada 50 µl a cada pozo.
<b>15</b>	Si su lector lee toda la placa a la vez, lea la placa hasta que el patrón 640 esté alrededor de 1.5 de OD.
<b>16</b>	Si su lector lee bien por pozo (BioTek), entonces lea sólo los dos pozos del patrón 640 cada minuto y agite el plato entre lecturas. Cuando estén alrededor de 0.9 de OD, comience a leer con más frecuencia. Cuando alcance 1.1 de OD, detenga la reacción añadiendo 25 µl de NaOH 3M a cada pozo. Agite las placas para detener la reacción. Incube la placa durante 5 minutos a temperatura ambiente y léala a 405 nm.

#### **15. Control de calidad interno**

A continuación se supone que ha determinado que las DBS se han almacenado correctamente y contienen anticuerpos activos. A menos que se haga esto, los resultados del Ov16 por ELISA no se pueden validar.

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i>			
N.º de rev. USF-002	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 9 de 14

### Análisis/Cálculos

El Ov16 por ELISA debe analizarse utilizando los siguientes criterios; si la ejecución del ELISA no cumple con estos criterios, debe repetirse.

A las diluciones de la curva estándar se les asignan las siguientes unidades arbitrarias:

Dilución	Unidades
250 ng/ml	640
125 ng/ml	320
62.5 ng/ml	160
31 ng/ml	80
15.5 ng/ml	40
8 ng/ml	20
4 ng/ml	10
2 ng/ml	5

Un gráfico de OD frente a unidades debe ser lineal en el rango de 10 a 160 unidades, con un valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es de  $>0.95$ . El rango dinámico para la parte lineal de la curva debe ser al menos 4 veces, es decir, el valor de OD para los 160 puntos unitarios debe ser al menos cuatro veces mayor que los 10 puntos unitarios. Los 40 puntos unitarios deben ser al menos el doble de las ODs del blanco. Los pozos duplicados en la curva del patrón deben estar dentro del 10 % entre sí.

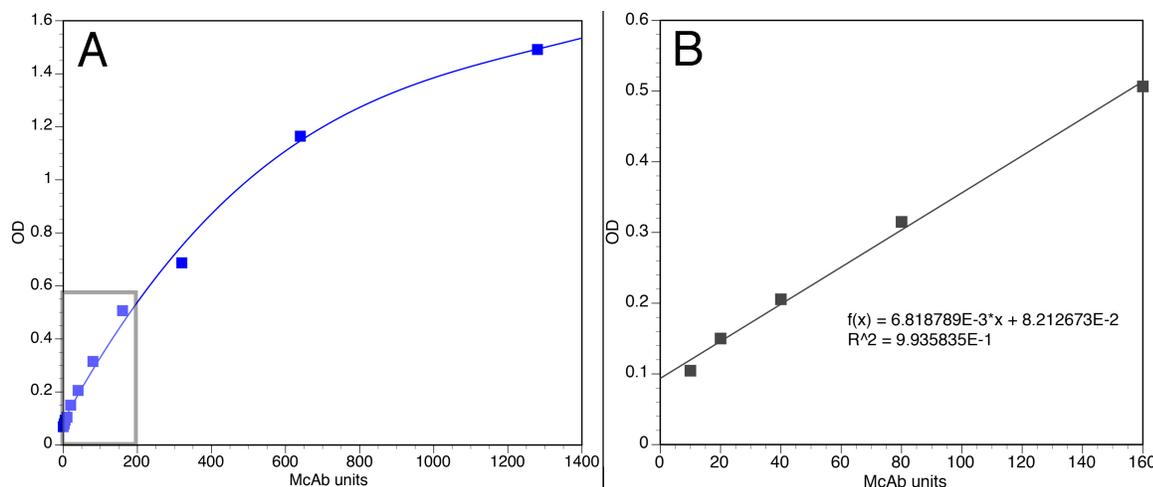


Figura 1: Ejemplo de una curva del patrón que ha superado los estándares de control de calidad. Panel A: Gráfico de todos los valores de OD frente a las unidades de McAb. Tenga en cuenta que el diámetro exterior para el punto unitario 640 es aproximadamente 1.1, lo que indica que el ensayo finalizó en el momento adecuado. El

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 10 de 14

área en el recuadro indica el área lineal de la curva. Pánel B: Nueva gráfica del área lineal de la curva. Tenga en cuenta que el valor de  $r^2$  es 0.993, que es mayor que 0.95. El valor de OD del punto unitario de 160 es 0.51, que es más de cuatro veces el valor del punto de unidad de 10 (0.10).

**16. Valores de referencia/Valores de alerta**

El límite se establece en 40 unidades arbitrarias.

**17. Interpretación de los resultados**

Las muestras con valores iguales o superiores a 40 unidades arbitrarias se consideran positivas. Las muestras con menos de 40 unidades arbitrarias se consideran negativas. Cualquier muestra para la cual ambas muestras duplicadas dan una lectura en o por encima de este punto se considera sospechosa de ser positiva. Si la muestra es sospechosa de ser positiva, repita el ensayo. Las muestras que den valores de OD en ambos ensayos que sean de al menos 40 unidades deben analizarse de la misma manera en pozos recubiertos con GST. Al ejecutar la placa GST, la primera columna debe recubrirse con Ov16 y la curva estándar debe ejecutarse como de costumbre. Cubra los pozos restantes que se van a analizar con las muestras de sangre sólo con GST. Las muestras que den un valor de OD superior a 40 unidades en ambos ensayos cuando se analicen con respecto a Ov16 y que den un OD correspondiente a menos de 20 unidades cuando se ensayen sólo con GST son positivas confirmadas.

**18. Revisión y aprobación de resultados**

El personal que realizó el ensayo verificará y aprobará los datos de laboratorio. El supervisor del laboratorio revisará los resultados. El director del laboratorio revisará y aprobará los resultados.

**19. Presentación de informes de resultados; Pautas para la notificación**

Ingrese los resultados en el sistema de seguimiento de archivos designado por el laboratorio. Informe los resultados de acuerdo con los procedimientos de notificación de laboratorio al remitente.

**20. Retención y almacenamiento de muestras**

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 11 de 14

La DBS eluida y la DBS sobrante se etiquetarán correctamente y se almacenarán en el congelador designado.

## 21. Gestión de registros

Las hojas de datos de todas las etapas del proceso se mantendrán en el laboratorio como se describe en sus Sistemas de gestión de calidad. Estos registros deberán estar fácilmente disponibles para auditoría o revisión en todo momento.

## 22. Referencias

- 22.1. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.<sup>a</sup> Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.<sup>a</sup> Edición | Portal de laboratorios de los CDC | CDC](#)). Consultado el 3 de abril de 2023

## 23. Anexos/Apéndices

### Apéndice 1

Preparación del tampón de recubrimiento (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 9.6):

1. Disuelva 8.4 g de NaHCO<sub>3</sub> en 900 ml de agua destilada o desionizada.
2. Compruebe el pH de la solución con el medidor de pH. Debe tener un pH de 9.5 a 9.7.
3. Agregue agua hasta alcanzar un volumen final de 1 litro.
4. La etiqueta debe incluir la fecha de preparación y de vencimiento (7 días después de la preparación). Almacene a 4 °C. No se debe de conservar durante más de una semana.

### 10X PBS:

#### 1. Pesar:

- 80 g de NaCl
- 2.0 g de KCl
- 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 14.4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2. Disuelva todos los ingredientes en 800 ml en agua destilada o desionizada y ajuste el volumen final a 1 l.

3. Compruebe el pH con el medidor de pH. Debe tener un pH de 7.0 a 7.4.

4. La etiqueta debe incluir la fecha de preparación y de vencimiento. Almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 2

Preparación de PBS Tween (PBST):

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 12 de 14</b>

1. Medir y mezclar:  
100 ml de 10X PBS  
0.5 ml de Tween 20  
900 ml de agua destilada o desionizada

Nota: el tampón Tween 20 es muy viscoso y puede ser difícil de pipetear con precisión. Para que esto sea más fácil, diluya calentándolo durante un corto período en un microondas, en la incubadora a 56 °C ó en un baño de agua.

2. La etiqueta debe incluir la con fecha de preparación y de vencimiento. Conservar en un frasco con atomizador a temperatura ambiente.

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-002	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 13 de 14

### Apéndice 3

#### Preparación de PBST-BSA

1. Disuelva 5 g de BSA en 100 ml de PBST.
2. La etiqueta debe incluir la fecha de preparación y de vencimiento.
3. Almacene a 4 °C.

#### Solución quelante (NaOH 3M)

1. Disuelva 12 g de NaOH en 80 ml de agua desionizada o destilada.
2. Ajuste el volumen final a 100 ml.
3. La etiqueta debe incluir la fecha de preparación y de vencimiento.
4. Almacene a temperatura ambiente.

### 24. Historial de revisiones

N.º de rev.	N.º de DCR	Cambios realizados en el documento	Fecha
Nuevo		Nuevo documento	01/

### 25. Firmas de aprobación

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Autor

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y título ó grado en letra de  
imprensa

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Revisor de SME

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_



2. USF-003 Extracción de ADN de moscas negras *Simulium* para detectar *Onchocerca volvulus*

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 1 de 14

## 1. Propósito

Este protocolo describe la extracción de ADN de moscas negras *Simulium* para la detección de estadios larvales infecciosos de *Onchocerca volvulus*, el agente causal de la oncocercosis (ceguera de los ríos). La extracción de ADN será de grupos individuales de hasta 100 moscas negras capturadas en la naturaleza. La prevalencia de moscas portadoras de larvas infecciosas es uno de los principales parámetros recomendados por la OMS para detener los estudios de MDA y es el único criterio utilizado por la OMS para verificar la eliminación de la transmisión.

## 2. Alcance

Este procedimiento se aplica a los laboratorios que pertenecen a la Red de Diagnóstico de Laboratorios de Oncocercosis administrada por la USFCC que analizarán grupos de moscas para detectar infecciones con *Onchocerca volvulus*.

Las moscas deben recolectarse en el campo de acuerdo con los métodos de recolección estándar y conservarse en etanol o isopropanol al 70 % como mínimo. Clasifique las moscas de acuerdo con los criterios morfológicos cuando estén en el laboratorio y procese sólo las identificadas como *Simulium damnosum sensu lato*. Registre el número de *S. damnosum s.l.* en cada grupo en una hoja de cálculo de Excel antes de comenzar el procesamiento.

### NOTA 1:

Este protocolo consiste en abrir las placas de PCR y analizar la muestra después de la PCR. Esto significa que está trabajando con amplicones posteriores a la PCR, que son un riesgo importante para la contaminación por retroceso, lo que crea problemas técnicos que pueden tardar meses en resolverse. **ES FUNDAMENTAL** que todos los pasos previos a la PCR estén estrictamente aislados de los realizados después de la PCR. Esto significa que **NADA** deben pasar de la zona de post PCR/ELISA a la zona de pre PCR/PCR. Para asegurarse de que esto no suceda, debe separar físicamente las áreas de pre PCR/PCR y el área de post PCR, idealmente en salas separadas. **NO inicie este protocolo si ha estado trabajando en el área post PCR/ELISA ese día.** Use guantes durante todo el procedimiento.

### NOTA 2:

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 2 de 14

El laboratorio debe tener un espacio designado para cada actividad, con: a) equipo de protección personal dedicado que incluya batas de laboratorio, guantes y gafas; b) instrumentos; c) suministros; y, d) juegos de pipetas para el aislamiento del ADN. Los laboratorios deben tener un flujo de trabajo definido de manera inequívoca, y el personal no debe moverse del área de post PCR a el área de pre PCR/PCR durante el día. Si va a hacer tanto una PCR como un ELISA post PCR el mismo día, configure primero la PCR y LUEGO haga el ELISA de PCR.

Todos los trabajos de laboratorio deben utilizar puntas de barrera contra aerosoles para evitar la contaminación.

**Nota 3:**

También es mejor separar los pasos de aislamiento de ADN y PCR por tiempo. Por ejemplo, primero se prepara el ADN de todos los grupos y, una vez que se prepara el ADN, se procede a los análisis de PCR y post PCR.

Todos los reactivos y tampones deben prepararse con agua destilada o desionizada de alta calidad.

**3. Documentos relacionados**

Título	Número de control del documento
Manual de aseguramiento externo de la calidad	USF-001

**4. Responsabilidad**

Cargo	Tareas
Personal de pruebas de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las políticas y procedimientos del laboratorio</li> <li>• Leer y comprender el protocolo</li> <li>• Realizar pruebas de acuerdo con el protocolo</li> <li>• Registrar los resultados según el protocolo</li> </ul>

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 3 de 14

Supervisor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollar e implementar políticas, procesos y procedimientos para garantizar que todas las funciones críticas del laboratorio se lleven a cabo en condiciones controladas</li> <li>• Asegurarse de que todo el personal de pruebas esté capacitado y bien informado.</li> <li>• Revisar y aprobar los resultados</li> </ul>
------------	--

## 5. Definiciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

USF: Universidad del Sur de Florida

MDP: Programa de donación de Mectizán

USFCC: Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF

## 6. Equipos/Materiales para la separación de cabezas y cuerpos de las moscas

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Soporte para tubos de 96 pozos Flipper	Cualquiera	
Calentador de bloque seco	Cualquiera	
Congelador de -70 °C	Cualquiera	
Congelador de -20 °C	Cualquiera	
Micropipetas ajustables de 1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	Cualquiera	
Micropipeta multicanal de 20-200 µl	Cualquiera	
Microcentrífuga (capacidad de 12 o 24 tubos) con capacidad de 14,000 xg	Cualquiera	
Agitador de tubos	Cualquiera	
Mezclador de tubos de vórtice	Cualquiera	
Termociclador	Cualquiera	
Separador magnético de 96 pozos	Cualquiera o Fisher	12331D
Medidor de pH	Cualquiera	
Balanza de carga superior con una exactitud de 10 mg	Cualquiera	

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 4 de 14

Balanza analítica con una exactitud de 0.1 mg	Cualquiera	
---	------------	--

## 7. Reactivos y suministros

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Guantes de látex o nitrilo	Cualquiera	
Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml o 1.7 ml	Cualquiera	
Homogeneizadores desechables de plástico azul	Fisher	
Puntas de barrera contra aerosoles (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Cualquiera	
Placas de PCR de 96 pozos	Cualquiera	
Selladores de placas de PCR	Cualquiera	
Etanol al 95 %	Cualquiera	
Tampón TE (Tris-HCl 10mM, EDTA disódico 1 mM, pH 8.0)	preparado en el laboratorio o Fisher	BP2473
10 mg/ml proteinasa K	Fisher	BP1700-100
TDT 1 M	Fisher	BP172
Tris HCl 1 M (pH 7.5)	Preparado en el laboratorio	
NaCl 4M	Preparado en el laboratorio	
OVS2-biotina 0.5 µM (5'B-AATCTCAAAAAACGGGTACATA-3', donde B = biotina)	Proporcionado por el USFCC	
Dynabeads M-280 recubiertas de estreptavidina	Invitrogen	#112-05D
Tampón aglutinante de perlas (Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM).	Preparado en el laboratorio	
Agua de grado para PCR	Cualquiera	
Base Tris	Cualquiera	
EDTA disódico dihidratado	Cualquiera	
DTT	Fisher	BP172
NaCl	Cualquiera	

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 5 de 14

## 8. Suministros, otros materiales

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Agua destilada o desionizada También se aceptan reactivos o agua de grado molecular.	Cualquiera	

## 9. Precauciones de seguridad

- 9.1. Los procedimientos deben realizarse de conformidad con todas las políticas y procedimientos de seguridad institucionales, de acuerdo con Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.ª Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.ª Edición | Portal de laboratorio de los CDC | CDC](#)).
- 9.2. **Equipo de protección personal:** se debe usar protección para los ojos, guantes y bata de laboratorio en todo momento
- 9.3. **Requisitos de contención:** se aplican precauciones universales.
- 9.4. **Respuesta a derrames:** N/C

## 10. Obtención, almacenamiento, conservación y transporte de muestras

Las moscas deben recolectarse en el campo de acuerdo con los métodos de recolección estándar y conservarse en etanol al 95% o isopropanol al 70%, lo que esté disponible a nivel local. Clasifique las moscas de acuerdo con los criterios morfológicos cuando estén en el laboratorio y procese sólo las identificadas como *Simulium damnosum sensu lato*.

11. **Registro de la muestra** El laboratorio de pruebas introduce la información del lote en un documento maestro de Excel "O-150 PCR ELISA". A cada lote de muestras se le asignará un identificador único que permite el seguimiento de muestras y lotes.

## 12. Control de calidad

Controles positivos y negativos según lo dispuesto por la USFCC

## 13. Flujo de trabajo o tabla de procesos (opcional)

- 13.1. Indicar los números de edificio y sala donde se procesarán las muestras.
- 13.2. Indicar los números de edificio y habitación donde se ubicarán los congeladores.

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 6 de 14

- 14. Procedimiento para el procesamiento de moscas negras, en la sala de procesamiento de moscas negras.**
- 14.1. Planifique las extracciones de ADN en lotes de 12 grupos de moscas a la vez, considerando que cada lote incluirá dos simulaciones de extracción. La cantidad de grupos de moscas se puede ajustar en función de **la capacidad de su centrífuga**. Las dos simulaciones de extracción son tubos vacíos que se llevan a cabo a través del proceso, exactamente como si contuvieran moscas. **Estos son necesarios para garantizar que el proceso de extracción de ADN permanezca libre de contaminación.**
  - 14.2. Enjuague las moscas con etanol al 95 %. Vierta las moscas en una placa de Petri. Deje que el etanol se evapore hasta que las moscas parezcan secas. No permita que las moscas se sequen por completo, o la separación de las cabezas no funcionará.
  - 14.3. Coloque las moscas en un tubo centrífugo cónico de polipropileno de 15 ml, limpio y seco. Etiquete el tubo.
  - 14.4. Coloque el tubo a -70 °C durante al menos 2 horas, o en la fase de vapor de nitrógeno líquido (si está disponible) durante al menos 30 minutos.
  - 14.5. Separe las cabezas de los cuerpos de moscas golpeando el tubo vigorosamente contra la alfombrilla de espuma colocada en el banco. Esto separará las cabezas de los cuerpos.
  - 14.6. Vuelva a suspender las cabezas y los cuerpos separados en etanol al 95 % y retírelos del tubo con una pipeta de transferencia de plástico ancha. La cantidad de etanol no es importante, pero trate de obtener todo el material de las moscas.
  - 14.7. Vierta la mezcla de etanol/moscas a través de un tamiz de malla 25 conectado a una bandeja. Los cuerpos se acumularán en el tamiz y las cabezas pasarán. Enjuague las moscas recogidas en el tamiz para asegurarse de que pasen todas las cabezas.
  - 14.8. Recoja las cabezas de la bandeja y los cuerpos del tamiz con una pipeta de transferencia con una amplia abertura y colóquelas en placas de Petri separadas de 35 mm. Examínelas con el microscopio para confirmar que la separación fue exitosa.
  - 14.9. Recoja las cabezas separadas de la placa de Petri con una pipeta de transferencia de amplia apertura y transfíralas a tubos de 1.5 ml con tapón a presión, etiquetados de la siguiente manera: HNNN, donde H = Cabezas y NNN = es el número de muestra del grupo. Etiquete otro tubo, B001 (B = Cuerpos, 001 = mismo número de muestra).
  - 14.10. Después de recolectar las cabezas, proceda de manera similar a recolectar los cuerpos separados de la placa de Petri: utilice una pipeta de transferencia de amplia apertura y transfíralos a un tubo de 1,5 ml con tapón a presión, etiquetado como BNNN, donde B

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 7 de 14

= Cuerpos y NNN = es el correspondiente al número de muestra del grupo. El número de muestra del grupo debe ser el mismo en los tubos H y B.

- 14.11. Las muestras se pueden mantener a 4 °C indefinidamente o se puede pasar directamente a la sección de aislamiento de ADN.
- 15. Procedimiento para la extracción de ADN de cabezas ó cuerpos de moscas negras**
- 15.1. Planifique las extracciones de ADN en lotes de 12 grupos a la vez, considerando que cada lote incluirá dos extracciones simuladas. La cantidad de grupos se puede ajustar en función de **la capacidad de su centrífuga**. Las dos extracciones simuladas son tubos vacíos que se llevan a cabo a través del proceso exactamente como si contuvieran cabezas ó cuerpos. **Estos son necesarios para garantizar que el proceso de extracción de ADN permanezca libre de contaminación.**
- 15.2. Enjuague cada uno de los tubos de muestra del grupo seleccionado tres veces con etanol al 95 %. Elimine la mayor cantidad posible de etanol con una pipeta de punta estrecha o una punta de 200 µl.
- 15.3. Deje que el etanol se evapore durante unos 10 minutos a temperatura ambiente.
- 15.4. Agregue 200 µl de tampón TE a las cabezas ó cuerpos, homogeneice las cabezas ó cuerpos con un homogeneizador de plástico azul desechable. Continúe hasta que las cabezas ó cuerpos estén completamente fragmentados.
- 15.5. Añada 40 µl de 10 mg/ml de proteinasa K.
- 15.6. Incube 2 horas a 56 °C en el calentador de bloque seco.
- 15.7. Agregue 20 µl de DTT 1 M y agregue 240 µl de TE para llevar el volumen total a aproximadamente 500 µl.
- 15.8. Perfore la parte superior del tubo con una aguja para proporcionar ventilación e incube a 95 °C durante 30 minutos. Es necesario observar los tubos de cerca, ya que algunos podrían abrirse durante la incubación. Si esto sucede, ciérrelos inmediatamente para evitar la contaminación cruzada.
- 15.9. Congele y descongele el extracto dos veces.
- 15.10. Congele los tubos a -70 °C durante al menos 15 minutos y descongele en el banco (durante aproximadamente otros 15 minutos o hasta que se descongelen por completo). NO descongele rápidamente calentándolo en la mano o en un baño de agua. Es necesaria una descongelación lenta para permitir que los cristales de hielo lisen las células y liberen el ADN.

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-003	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 8 de</b> 14

- 15.11. Centrifugue las muestras durante 5 minutos a máxima velocidad (14,000 xg), transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- 15.12. Agregue 50 µl Tris HCl 1 M (pH 7.5) y 12.5 µl de 4M NaCl a cada muestra.
- 15.13. Agregue 5 µl de OVS2-biotina 0.5 uM a cada muestra.
- 15.14. Incube los tubos a 95 °C durante tres minutos en un calentador de bloque seco y dejar que se enfríen lentamente a temperatura ambiente en la mesa de trabajo. Este enfriamiento lento permite que los oligonucleótidos encuentren e hibridicen el ADN del parásito en la muestra.
- 15.15. Preparación de la estreptavidina Dynabeads M-280. Mientras las muestras se enfrían, prepare las perlas, como fueron enviadas, en una solución con conservante.
- 15.16. Calcule el número de perlas necesarias para el número total de muestras con las que está trabajando. Necesita 10 µl por muestra de la solución madre de 10 mg/ml; por ejemplo, para 12 muestras necesitará 120 µl de perlas.
- 15.17. Vuelva a suspender las perlas en su vial original mediante vórtice durante >30 segundos o incline y gire el vial durante 5 minutos.
- 15.18. Transfiera el volumen deseado en lotes de 50 µl a los primeros pozos de la fila A de la placa de microtitulación (A1, A2, A3, A4, etc.). Coloque el plato en el imán y deje que las perlas se acumulen durante 2 minutos.
- 15.19. Lave las perlas con tampón aglutinante de 200 µl. Deje que las perlas se acumulen durante 5 minutos en el imán y retire y deseche con cuidado el sobrenadante. Repita el enjuague cuatro veces para un total de cinco enjuagues.
- 15.20. Retire la placa del imán y vuelva a suspender las perlas enjuagadas en el mismo volumen de tampón aglutinante que el volumen inicial de perlas extraídas del vial.
- 15.21. Agregue 10 µl de la solución de perlas enjuagadas a cada muestra. Incube las muestras en el agitador de tubos durante la noche a temperatura ambiente. (Nota: el procedimiento se puede detener aquí al final del primer día).
- 15.22. Pipetee 100 µl de las muestras en las filas B-H de la misma PCR anteriormente para preparar las perlas. Coloque la placa en el imán. Deje que las perlas se acumulen en el campo magnético durante cinco minutos.
- 15.23. Retire cuidadosamente el sobrenadante con una micropipeta, cambiando las puntas entre cada muestra. Pipetee secuencialmente otros 100 µl de la muestra en el pozo, dejando cinco minutos para que las perlas, después de cada adición, se acumulen en el

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-003	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 9 de</b> 14

lado del tubo que mira hacia el imán antes de retirar la solución y agregar la siguiente alícuota. Tenga cuidado de no alterar las perlas durante este proceso.

- 15.24. Enjuague las perlas 6 veces con 150 µl de tampón aglutinante por lavado, utilizando una pipeta multicanal. Para ello, retire la placa del imán, pipetee el enjuague en cada pozo con la pipeta multicanal y pipetee hacia arriba y hacia abajo para mezclar. Asegúrese de usar puntas de barrera contra aerosoles.
- 15.25. Una vez que las perlas se vuelvan a suspender, vuelva a colocar la placa en el imán y deje que las perlas se acumulen durante 5 minutos como antes. Retire con cuidado el enjuague como se indicó anteriormente. Repita este proceso cinco veces más para un total de 6 enjuagues.
- 15.26. Después del último enjuague, retire con cuidado la mayor cantidad posible de solución de las perlas recolectadas en el costado de los pozos. Vuelva a suspender las perlas en 20 µl de agua para PCR. Transfiera las muestras (solución y perlas) a una placa de PCR. Selle la placa con un sellador de placas.
- 15.27. Coloque la placa en el termociclador y ejecute el siguiente programa:
  - 80 °C durante 2 minutos
  - Reposo a 4 °C.
 Esto liberará el ADN capturado de las perlas magnéticas.
- 15.28. Coloque la placa encima del imán durante 2 minutos. Este paso consiste en recoger las perlas magnéticas.
- 15.29. Retire con cuidado el sobrenadante con una pipeta multicanal de 200 µl y transfiera el ADN extraído a una nueva placa. Coloque un sello en la placa. Etiquete la placa con la información de la muestra, las iniciales del personal del laboratorio y la fecha.  
Recordatorio: esta placa contiene el ADN purificado.
- 15.30. Guarde la placa a -20 °C hasta que se use para PCR.

## **16. Control de calidad interno**

Los dos tubos de simulación se analizarán mediante PCR.

## **17. Análisis/Cálculos**

No corresponde

## **18. Valores de referencia/Valores de alerta**

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 10 de 14

No corresponde

#### 19. Interpretación de los resultados

Si alguno de los tubos de simulación tiene resultados positivos de PCR, la PCR se repetirá sólo con los tubos de simulación. Si los resultados de la PCR continúan siendo positivos, esto podría invalidar el proceso de extracción de ADN debido a una posible contaminación.

#### 20. Revisión y aprobación de resultados

Este es el primer paso de un procedimiento y los resultados se informarán después de la amplificación por PCR.

#### 21. Presentación de informes de resultados; Pautas para la notificación

Cualquier hallazgo de la extracción de ADN se informará con los resultados de la amplificación por PCR.

#### 22. Retención y almacenamiento de muestras

El ADN extraído y el ADN sobrante se etiquetarán adecuadamente y se almacenarán en el congelador designado a -70 °C durante un mínimo de tres años.

#### 23. Gestión de registros

Las hojas de datos de todas las etapas del proceso se mantendrán en el laboratorio como se describe en sus Sistemas de gestión de calidad. Estos registros deberán estar fácilmente disponibles para auditoría o revisión en todo momento.

#### 24. Referencias

- 24.1. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.ª Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.ª Edición | Portal de laboratorios de los CDC | CDC](#)). Consultado el 3 de abril de 2023

#### 25. Anexos/Apéndices

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 11 de 14

### Apéndice 1

Preparación de la solución de Tris HCl 1 M, pH 7.5:

1. Disuelva 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el pH a 7.5 usando el medidor de pH y HCl.
3. Ajuste el volumen final a 1 litro con agua destilada o desionizada.
4. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 2

Preparación de Tris HCl 1M, pH 8.0:

1. Disuelva 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el pH a 8.0 usando el medidor de pH y HCl.
3. Ajuste el volumen final a 1 litro con agua destilada o desionizada.
4. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 3

Preparación de EDTA 500 mM:

1. Disuelva 186.1 g de EDTA disódico dihidratado en 350 ml de agua destilada o desionizada.
2. Agregue HCl o NaOH para ajustar el pH final a 8.0, usando el medidor de pH.
  - 2.1. Tenga en cuenta que el EDTA tardará mucho tiempo en disolverse y, a medida que se disuelve, el pH se aleja de 8.0.
3. Siga agregando ácido o NaOH hasta que se disuelva por completo y el pH sea 8.0.
4. Ajuste el volumen final a 500 ml con agua destilada o desionizada.
5. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 4

NaCl 4 M

1. Disuelva 116.9 g de NaCl en 300 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el volumen final a 500 ml con agua destilada o desionizada.
3. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 5

TDT 1 M:

1. Disuelva 154.3 mg de DTT en 900 µl de agua destilada o desionizada.
2. Ajustar el volumen final a 1 ml con agua destilada o desionizada.

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>			
N.º de rev. USF-003	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 12 de 14

3. Etiquete y almacene a -20 °C.

### Apéndice 6

Tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA disódico 1 mM, pH 8.0)

- Mida y mezcle:
  - 5 ml de Tris-HCl 1M, pH 8.0
  - 1 ml de EDTA 500 mM
  - 494 ml de agua destilada o desionizada
- Coloque una barra para revolver en el recipiente y mezcle en una placa para remover durante al menos un minuto
- Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 7

Tampón aglutinante de perlas (Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM):

- Mida y mezcle:
  - 50 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7.5
  - 12.5 ml de NaCl 4M
  - 437.5 ml de agua destilada o desionizada
- Coloque una barra para revolver en el recipiente y mezcle sobre una placa para revolver durante al menos un minuto
- Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 8

Proteinasas K de 10 mg/ml:

- Mida y mezcle
  - 50 mg de proteinasa K (peso)
  - 5 ml de tampón TE
- Coloque una barra para revolver en el recipiente y mezcle sobre una placa para revolver durante al menos tres minutos
- Etiquete 10 tubos de microcentrífuga de 1.5 para hacer alícuotas.
- Con una pipeta de 1000 µl y puntas, haga 10 alícuotas de 500 µl/alícuota.



USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-003	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 14 de</b> 14

3. USF-004 Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de *Onchocerca volvulus*

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-004	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 1 de 14

### 1. Propósito

Este protocolo describe la detección de larvas infecciosas de *Onchocerca volvulus*, el agente causal de la oncocercosis (ceguera de los ríos), en el ADN extraído de grupos individuales de hasta 100 moscas negras capturadas en la naturaleza (SOP USF-003). La prevalencia de moscas portadoras de larvas infecciosas es uno de los principales parámetros recomendados por la OMS para detener los estudios de MDA y es el único criterio utilizado por la OMS para verificar la eliminación de la transmisión.

### 2. Alcance

Este procedimiento se aplica a los laboratorios que pertenecen a la Red de Diagnóstico de Laboratorios de Oncocercosis gestionada por el Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF. Estos laboratorios realizarán la PCR en el ADN extraído de la cabeza ó el cuerpo de moscas *Simulium* como parte de las evaluaciones del programa para la eliminación del parásito *Onchocerca volvulus*.

### 3. Documentos relacionados

Título	Número de control del documento
Manual de Aseguramiento Externo de la Calidad	USF-001
Extracción de ADN de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>	USF-003
Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150	USF-005

### 4. Responsabilidad

Cargo	Tareas
Personal de pruebas de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las políticas y procedimientos del laboratorio</li> <li>• Leer y comprender el protocolo</li> <li>• Realizar pruebas de acuerdo con el protocolo</li> <li>• Registrar los resultados según el protocolo</li> </ul>

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 2 de</b> 14

Supervisor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollar e implementar políticas, procesos y procedimientos para garantizar que todas las funciones críticas del laboratorio se lleven a cabo en condiciones controladas</li> <li>• Asegurarse de que todo el personal de pruebas esté capacitado y bien informado.</li> <li>• Revisar y aprobar los resultados</li> </ul>
------------	--

#### 5. Definiciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

USF: Universidad del Sur de Florida

MDP: Programa de Donación Mectizán

USFCC: Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF

#### 6. Equipos/Materiales para la separación de cabezas y cuerpos de las moscas

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Campana limpia de PCR	Cualquiera	
Soporte para tubos de 96 pozos Flipper	Cualquiera	
Congelador a 70 °C	Cualquiera	
Congelador a -20 °C	Cualquiera	
Micropipetas ajustables de 1-20 µl, 200-200 µl, 200-1000 µl dedicadas a la preparación de mezclas maestras	Cualquiera	
Micropipeta ajustable de 1-20 µl dedicada para agregar el control positivo (área posterior a la PCR)	Cualquiera	
Micropipeta multicanal de 20-200 µl	Cualquiera	
Microcentrífuga (capacidad de 12 o 24 tubos) con capacidad de 14,000 xg	Cualquiera	
Mezclador de tubos de vórtice	Cualquiera	
Medidor de pH	Cualquiera	
Balanza de carga superior con una exactitud de 10 mg	Cualquiera	

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 3 de</b> 14

Termociclador convencional	BioRad	
----------------------------	--------	--

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-004	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 4 de 14

## 7. Reactivos y suministros

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Guantes de látex o nitrilo	Cualquiera	
Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml o 1.7 ml	Cualquiera	
Puntas de barrera contra aerosoles (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Cualquiera	
Placas de PCR de 96 pozos	Cualquiera	
Selladoras de placas PCR	Cualquiera	
Tampón de PCR 10X	Preparado en laboratorio	
Mezcla de dNTP 2 mM	preparado en laboratorio (existencias de Invitrogen)	
Soluciones matriz de dNTP	Termo Fisher	
Cebadores O-150 de 20 µM	Termo Fisher	
Polimerasa Taq	Cualquiera	
O-150 control positivo	USFCC	
Sulfato de amonio (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cualquiera	
Base Tris	Cualquiera	
MgCl <sub>2</sub>	Cualquiera	

## 8. Suministros, otros materiales

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Agua de grado PCR o molecular.	Cualquiera	

## 9. Precauciones de seguridad

- 9.1. Los procedimientos deben realizarse de conformidad con todas las políticas y procedimientos de seguridad institucionales, de acuerdo con Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.ª Edición de los CDC.
- 9.2. **Equipo de protección personal:** se debe usar protección para los ojos, guantes y bata de laboratorio en todo momento
- 9.3. **Requisitos de contención:** se aplican precauciones universales.
- 9.4. **Respuesta a derrames:** N/C

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 5 de</b> 14

**10. Obtención, almacenamiento, conservación y transporte de muestras**

ADN extraído y almacenado según SOP USF-003

**11. Registro de la muestra**

No corresponde; sin embargo, el laboratorio de ensayos debe tener un documento maestro de Excel "O-150 PCR ELISA" que permita el seguimiento de muestras y lotes.

**12. Control de calidad**

Controles positivos según lo dispuesto por USFCC.

**13. Flujo de trabajo o tabla de procesos (opcional)**

13.1. Indique los números de edificio y sala donde se preparará la mezcla maestra, se configurará y ejecutará el PCR y donde se leerá el ELISA.

13.2. Indique los números de edificio y sala donde se ubicarán los congeladores.

**14. Preparación de la mezcla maestra (área pre PCR/PCR)**

14.1. NO inicie este protocolo si ha estado trabajando en el área post PCR/ELISA ese día.

14.2. Use batas de laboratorio, guantes y gafas designadas para la sala de pre PCR/PCR durante todo el procedimiento.

14.3. La mezcla maestra debe prepararse en la campana limpia de PCR utilizando pipetas y puntas de barrera contra aerosoles dedicadas exclusivamente a la producción de mezclas maestras.

14.4. Lleve todos los reactivos de PCR (tampón 10X, cebadores, dNTP, polimerasa Taq) en una cubitera con hielo desde el congelador hasta la zona de pre PCR/PCR y deje que se descongelen. Mantenga la polimerasa Taq en hielo.

14.5. Centrifugue todos los reactivos durante 30 segundos.

14.6. Prepare la cantidad de mezcla maestra de acuerdo con el número de muestras que va a analizar. Consulte el cuadro a continuación para ver ejemplos de 1 reacción y 100 reacciones (una placa). Haga un 10 % extra para tener en cuenta las pérdidas durante el pipeteado.

14.7. Mezcle el contenido del tubo de mezcla maestra mediante un suave vórtice.

14.8. Retire la mezcla maestra de la campana limpia de PCR. Pipetee alícuotas de 45 µl de la mezcla maestra en cada pozo de una placa de PCR de 96 pozos.

14.9. Mantenga la placa en hielo y devuelva los reactivos al congelador.

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 6 de</b> 14

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen necesario para 1 reacción</b>	<b>Volumen necesario para 100 reacciones</b>
Agua para PCR	32 µl	3.2MI
Tampón 10X	5 µl	500 µl
dNTP2 mM	5 µl	500 µl
Cebador 1632 20uM	1.25 µl	125 µl
Cebador de biotina 1633 20 uM	1.25 µl	125 µl
Polimerasa Taq	0.5 µl	50 µl
<b>Volumen total</b>	<b>45 µl</b>	<b>4.5MI</b>

**15. Procedimiento para añadir el ADN extraído para la amplificación por PCR (área pre PCR/PCR)**

- 15.1. Los controles negativos deben agregarse antes de cualquier muestra o control positivo de ADN. Cada reacción de control negativo debe contener 5 µl de agua PCR en lugar del ADN.
- 15.2. Añada 5 µl de las muestras de ADN purificado seleccionadas utilizando una pipeta multicanal. Utilice la siguiente plantilla:

Neg	Pos	pos + ADN									
Muest	simulaci	simulación									
Muest	simulaci	simulación									
Muest	simulaci	simulación									
Muest	simulaci	simulación									
Muest	simulaci	simulación									
Muest	simulaci	simulación									

- 15.3. Cada placa de PCR completa tendrá hasta dos reacciones de control positivo (en los pozos A11 y A12) y 10 reacciones de control negativo (en las filas A1-A10). En general, debería poder hacer 84 reacciones de PCR en cada placa de ELISA. En total, esto significa

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 7 de</b> 14

que una sola placa contendrá ADN de 70 grupos de cabezas ó cuerpos, 14 extracciones simuladas, 10 controles negativos y dos controles positivos.

## 16. Agregación de controles positivos

- 16.1. Cubra la placa y mueva la placa al **área post PCR**.
- 16.2. En el área post PCR, dedique una pequeña área del banco alejada de todas las demás actividades como el área para agregar el control positivo.
- 16.3. Coloque la placa en esta área y agregue el control positivo (ver **Apéndice 1** para la preparación del control positivo) utilizando la pipeta dedicada a este fin.
- 16.4. En el pozo A11, agregue 2.5 µl del ADN de control positivo de PCR más 2.5 µl de ADN de una preparación de un grupo de cabezas ó cuerpos que haya dado negativo anteriormente. Alternativamente, añada 2.5 µl de ADN que se preparó a partir de un grupo de 100 cabezas ó cuerpos que se sabe que no están infectadas (moscas recolectadas de una región no endémica confirmada).
- 16.5. En el pozo A12, agregue 2,5 µL del ADN de control positivo (de 16.3 arriba).
- 16.6. Selle con un sellador de placas.
- 16.7. Cámbiese los guantes y **regrese al área pre PCR**.
- 16.8. Coloque la placa en el termociclador y proceda a la amplificación por PCR. Los parámetros de ciclo para las amplificaciones de PCR son los siguientes:
  - Paso 1: 94 °C durante 1 min
  - Paso 2: 37 °C durante 2 min
  - Paso 3: 72 °C durante 30 segundos
  - Paso 4: Repita los pasos 1 a 3 durante un total de 5 ciclos
  - Paso 5: 94 °C durante 30 segundos
  - Paso 6: 37 °C durante 30 segundos
  - Paso 7: 72 °C durante 30 segundos
  - Paso 8: Repita los pasos 5 a 7 para un total de 35 ciclos
  - Paso 9: Mantener a 4 °C

## 17. Análisis/Cálculos

No corresponde

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 8 de</b> 14

**18. Valores de referencia/Valores de alerta**

No corresponde

**19. Interpretación de los resultados**

Si alguno de los tubos de simulación tiene resultados positivos de PCR, la PCR se repetirá sólo con los tubos de simulación. Si los resultados de la PCR continúan siendo positivos, esto podría invalidar el proceso de extracción de ADN debido a una posible contaminación.

El control positivo en el pozo A12 dirá si la reacción de PCR funcionó de la manera más eficiente posible. El control positivo en el pozo A11 (pozo con 2.5 µl de ADN de cabezas ó cuerpos de moscas negativas conocidas) demostrará que las preparaciones de ADN de cabezas ó cuerpos de moscas no inhiben la PCR.

**20. Revisión y aprobación de resultados**

Este es el primer paso de un procedimiento y los resultados se informarán después de la amplificación por PCR.

**21. Presentación de informes de resultados; Pautas para la notificación**

Cualquier hallazgo de la extracción de ADN se informará con los resultados de la amplificación por PCR.

**22. Retención y almacenamiento de muestras**

El ADN extraído y el ADN sobrante se etiquetarán adecuadamente y se almacenarán en el congelador designado a -70 °C durante un mínimo de tres años.

**23. Gestión de registros**

Las hojas de datos en las bitácoras de trabajo de todas las etapas del proceso se mantendrán en el laboratorio como se describe en sus Sistemas de gestión de calidad. Estos registros deberán estar fácilmente disponibles para auditoría o revisión en todo momento.

**24. Referencias**

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 9 de</b> 14

24.1. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.<sup>a</sup> Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.<sup>a</sup> Edición | Portal de laboratorios de los CDC | CDC](#)). Consultado el 3 de abril de 2023

## 25. Anexos/Apéndices

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-004	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 10 de 14

## Apéndice 1

### Preparación del control positivo de O-150.

Al recibir de USF, los controles positivos de O-150 deben calibrarse a través de la reactividad de PCR de diluciones en serie.

1. Trabaje y prepare las diluciones en la zona post PCR/ELISA utilizando la pipeta dedicada para agregar el control positivo.
2. Configure seis diluciones en serie de 10 veces el material de control positivo que se va a utilizar. Para ello, comience a diluir 2.5 µl del control positivo sin diluir de USF en 22.5 µl de tampón TE 8.0. Esta es su dilución 1/10. Tome 2.5 µl de la dilución 1/10 y añádalo a 22.5 µl de tampón TE 8.0. Esta es su dilución 1/100. Continúe haciendo diluciones de la misma manera hasta que haya hecho un total de 6 diluciones de 10 veces. Las diluciones se pueden preparar en placas de PCR o tubos de amplificación de PCR.
3. Prepare la mezcla maestra para 10 reacciones siguiendo las instrucciones del punto 14 anterior.
4. Coloque 47.5 µl de mezcla maestra en nueve pozos (si se utiliza una placa) o tubos de PCR.
5. Añada 1.5 µl de agua PCR a cada pozo/tubo
6. Añada 1 µl de cada dilución en serie del ADN de control positivo. Vea la plantilla de placa propuesta a continuación

1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				
1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	Neg	Neg				

7. Realice la corrida de PCR utilizando las condiciones de amplificación descritas en el punto 15 anterior.
8. Identifique la dilución más alta que dé un resultado positivo de PCR. Utilizando la dilución que sea 100 veces más concentrada que esta dilución (por ejemplo, si detecta 1/100,000 de forma fiable, tome 1/1,000) y prepare 100 µl de esta dilución diluyendo 10 µl de la dilución 100 veces en 90 µl de tampón TE 8.0.

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-004	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 11 de 14

9. Utilice 2.5 µl de esta dilución como control positivo en todos los experimentos posteriores. Almacene todas las diluciones a -20 °C.

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-004	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 12 de 14

### Apéndice 2

Preparación de Tris HCl 1M, pH 9.0:

1. Disuelva 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el pH a 9.0 usando el medidor de pH y HCl.
3. Ajuste el volumen final a 1 litro con agua destilada o desionizada.
4. Etiquete, autoclave y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 3

Preparación de sulfato de amonio 1M ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):

1. Disuelva 13.2 g de sulfato de amonio en 80 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el volumen final a 100 ml con agua destilada o desionizada.
3. Etiquete, autoclave y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 4

Preparación de cloruro de magnesio 1M (MgCl<sub>2</sub>):

1. Disuelve 9.5 g de cloruro de magnesio en 80 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el volumen final a 100 ml con agua destilada o desionizada.
3. Etiquete, autoclave y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 5

Preparación del tampón de PCR 10X:

1. Prepare 50 ml a partir de soluciones esterilizadas en autoclave mezclando:

Reactivo/concentración	Concentración final	Volumen a añadir
Tris-HCl 1M (pH 9.0)	600 mM	30 ml
1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	150 mM	7.5 ml
MgCl <sub>2</sub> 1 M	20 mM	1.0 ml
Agua para PCR	---	11.5 ml

2. Tome alícuotas en tubos de 1.5 ml.

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
N.º de rev. USF-004	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 13 de 14

- Etiquete y almacene a -20 °C.

### Apéndice 6

#### Preparación de dNTP, 2 mM cada uno

- Prepare 5 ml con los siguientes reactivos:

Reactivo/concentración	Concentración final	Cantidad a añadir
dATP 100 mM	2 mM	100 µl
dATP 100 mM	2 mM	100 µl
dATP 100 mM	2 mM	100 µl
dATP 100 mM	2 mM	100 µl
Agua para PCR	---	4.6 ml

- Tome alícuotas de 1 ml en tubos de 1.5 ml.
- Etiquete y almacene en -20°C.

### Apéndice 7

#### Preparación de cebadores:

- Las secuencias de cebadores para este ensayo son:  
1632: 5' GATTYTTCCGRCGAANARCGC 3'  
Biotina de 1633: 5' biotina-GCNRTRTAAATNTGNAAATTC 3'  
Donde, N = A, G, C OR T, Y = C OR T, R = A OR G
- La hoja de especificaciones del cebador indicará el número total de nmol que le dieron. Disuelva los cebadores en 10 veces el número de µl de agua para PCR que hay en el tubo. Por ejemplo, si dicen que hay 38 nmol en el tubo en la hoja de especificaciones, disuelva el cebador en 380 µl de agua para PCR. Esto produce una solución matriz de 100 µM.
- Tome alícuotas de las soluciones matriz en alícuotas de 100 µl en tubos de microfuga con tapón de rosca y almacene a -80°C. Agregue 400 µl de agua para PCR para obtener una solución de trabajo de 20 µM.
- Etiquete y almacene las soluciones de trabajo a -20 °C.

### Apéndice 8

#### Proteinasa K de 10 mg/ml:

- Mida y mezcle  
50 mg de proteinasa K (peso)

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i></b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-004	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 14 de 14

5 ml de tampón TE

2. Coloque una barra para revolver en el recipiente y mezcle sobre una placa para revolver durante al menos tres minutos
3. Etiquete 10 tubos de microcentrífuga de 1.5 para hacer alícuotas.

**26. Historial de revisiones**

N.º de rev.	N.º de DCR	Cambios realizados en el documento	Fecha
Nuevo		Nuevo documento	01/

**27. Firmas de aprobación**

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Autor Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Revisor de SME Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF Fecha

#### 4. USF-005 Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150			
N.º de rev. USF-005	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 1 de 16

### 1. Propósito

Este protocolo describe la detección de ADN basada en ELISA de larvas en fase infecciosa de *Onchocerca volvulus*, después de la amplificación por PCR de O-150 de grupos individuales de hasta 100 moscas negras capturadas en la naturaleza (SOP USF-004).

### 2. Alcance

Este procedimiento se aplica a los laboratorios que pertenecen a la Red de Diagnóstico de Laboratorios de Oncocercosis gestionada por el Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF. Estos laboratorios realizarán PCR en el ADN extraído de la cabeza ó el cuerpo de moscas *Simulium* como parte de las evaluaciones del programa para la eliminación del parásito *Onchocerca volvulus*.

### 3. Documentos relacionados

Título	Número de control del documento
Manual de Aseguramiento Externo de la Calidad	USF-001
Extracción de ADN de cabezas ó cuerpos de moscas negras <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>	USF-003
Amplificación de O-150 por PCR de punto final de ADN de <i>Onchocerca volvulus</i>	USF-004

### 4. Responsabilidad

Cargo	Tareas
Personal de pruebas de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las políticas y procedimientos del laboratorio</li> <li>• Leer y comprender el protocolo</li> <li>• Realizar pruebas de acuerdo con el protocolo</li> <li>• Registrar los resultados según el protocolo</li> </ul>

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 2 de</b> 16

Supervisor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollar e implementar políticas, procesos y procedimientos para garantizar que todas las funciones críticas del laboratorio se lleven a cabo en condiciones controladas</li> <li>• Asegurarse de que todo el personal de pruebas esté capacitado y bien informado.</li> <li>• Revisar y aprobar los resultados</li> </ul>
------------	--

## 5. Definiciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

USF: Universidad del Sur de Florida

MDP: Programa de Donación Mectizán

USFCC: Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF

## 6. Equipos/Materiales para la separación de cabezas y cuerpos de las moscas

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Incubadora ambientada en 37 °C	Cualquiera	
Incubadora configurada en 42 °C	Cualquiera	
Incubadora configurada en 56 °C	Cualquiera	
Refrigerador a 4 °C	Cualquiera	
Congelador a -20 °C	Cualquiera	
Frascos rociadores tamaño 500 ml	Cualquiera	
Micropipetas ajustables de 1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl	Cualquiera	
Micropipeta ajustable de 1-20 µl dedicada para agregar el control positivo (área posterior a la PCR)	Cualquiera	
Micropipeta multicanal de 20-200 µl	Cualquiera	
Lector de placas de ELISA capaz de leer a 650 nm	Cualquiera	
Mezclador de tubos de vórtice	Cualquiera	
Medidor de pH	Cualquiera	

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 3 de</b> 16

Balanza de carga superior con una exactitud de 10 mg	Cualquiera	
--	------------	--

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 4 de</b> 16

## 7. Reactivos y suministros

<b>Artículo</b>	<b>Proveedor recomendado</b>	<b>Número de catálogo</b>
Guantes de látex o nitrilo	Cualquiera	
Puntas de barrera contra aerosoles (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Cualquiera	
Selladores de placas		
Estreptavidina 1mg/ml	Termo Fisher	434301
Placas de fondo redondo Immunolon 2 HB	Fisher	
Toallas de papel	Cualquiera	
Depósitos de reactivos de 50 ml	Cualquiera	
Tampón de recubrimiento	Preparado en laboratorio	
Solución de TBST	Preparado en laboratorio	
Tampón de hibridación	Preparado en laboratorio	
Hidróxido de sodio (NaOH)	Cualquiera (local)	
Sonda OVS2-FI	USFCC	
Fragmentos de anti-fluoresceína-AP conjugado con Fab	Termo Fisher	11426338910
Sistema de detección Blue Phos	KPL	50-88-22
Solución quelante AP	KPL	50-89-00
Tampón de lavado SSPE/SDS	Preparado en laboratorio	
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	Cualquiera	
Carbonato de sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Cualquiera	
Base Tris	Cualquiera	
Tween 20	Cualquiera	
NaCl	Cualquiera	
Albúmina sérica bovina, fracción V (BSA)	Cualquiera	
Fosfato de sodio dibásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Cualquiera	
EDTA disódico dihidratado	Cualquiera	
Polivinilpirrolidona	Cualquiera	
Ficoll 400	Cualquiera	

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 5 de</b> 16

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Cualquiera	
N-lauril sarcosina	Cualquiera	

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
N.º de rev. USF-005	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 6 de 16

## 8. Suministros, otros materiales

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Agua destilada o de grado reactivo.	Cualquiera	

## 9. Precauciones de seguridad

- 9.1. Los procedimientos deben realizarse de conformidad con todas las políticas y procedimientos de seguridad institucionales, de acuerdo con Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.ª Edición de los CDC.
- 9.2. **Equipo de protección personal:** se debe usar protección para los ojos, guantes y bata de laboratorio en todo momento
- 9.3. **Requisitos de contención:** se aplican precauciones universales.
- 9.4. **Respuesta a derrames:** N/C

## 10. Obtención, almacenamiento, conservación y transporte de muestras

Este SOP es para detectar ADN en placas que se sometieron a amplificación por PCR como se describe en SOP USF-004. Las placas deben leerse el mismo día o al día siguiente de la amplificación por PCR. Las placas deben permanecer cubiertas y almacenadas a 4 °C hasta que comience la prueba ELISA.

## 11. Registro de la muestra

No corresponde; sin embargo, el laboratorio de ensayos debe tener un documento maestro de Excel "O-150 PCR ELISA" que permita el seguimiento de muestras y lotes.

## 12. Control de calidad

Los controles positivos se incluyeron en el procedimiento de amplificación por PCR (SOP USF-004) y previamente proporcionados por USFCC.

## 13. Flujo de trabajo o tabla de procesos (opcional)

- 13.1. Indique los números de edificio y sala donde se preparará la mezcla maestra, se configurará y ejecutará el PCR y donde se leerá el ELISA.
- 13.2. Indique los números de edificio y sala donde se ubicarán los congeladores.

## 14. Preparación para ELISA (área post PCR)

- 14.1. Cuando se haya completado la PCR, retire la placa del termociclador y muévela al área post PCR sin abrir la placa. NO abra la placa hasta que esté en el área post PCR. Una vez que haya abierto la placa, NO regrese a la zona de pre PCR/PCR ese día. Si es necesario regresar al área de pre PCR/PCR, vaya a casa primero, cámbiese de ropa y dúchese antes de regresar al laboratorio.

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 7 de 16

- 14.2. Use guantes durante todo el procedimiento. Quítese los guantes y deséchelos antes de abandonar el área post PCR/ELISA.
- 14.3. Cubra una placa (o el número requerido de pozos) con estreptavidina agregando 100 µl de una solución de trabajo de 1 µg/ml de estreptavidina en tampón de recubrimiento a cada pozo. Cubra la placa con sellador de placas.
- 14.4. Incube la placa a 4 °C durante la noche.
- 14.5. Vacíe el plato en el fregadero. Enjuague el pozo seis veces con TBST a temperatura ambiente. Invierta la placa entre lavados sobre una toalla de papel para eliminar el líquido de lavado residual.
- 14.6. Añada 20 µl de tampón de hibridación a cada pozo recubierto con una pipeta multicanal.
- 14.7. Agregue 5 µl de cada producto de PCR a los pozos apropiados.
- 14.8. Incube la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 14.9. Durante el período de incubación, prepare la solución de trabajo de la sonda OVS2-FL (100 ng/ml en tampón de hibridación).
- 14.10. Vacíe el plato en el fregadero. Enjuague el pocillo seis veces con TBST a temperatura ambiente. Invierta la placa entre lavados sobre una toalla de papel para eliminar el líquido de lavado residual.
- 14.11. Agregue 100 µl de NaOH 1 M a cada pozo e incube durante un minuto a temperatura ambiente.
- 14.12. Vacíe el plato en el fregadero. Enjuague el pozo seis veces con TBST a temperatura ambiente. Invierta la placa entre lavados sobre una toalla de papel para eliminar el líquido de lavado residual.
- 14.13. Añada 50 µl de la solución de trabajo de la sonda OVS2-FL e incube a 42 °C durante 15 minutos.
- 14.14. Vacíe el plato en el fregadero. Enjuague el pozo seis veces con la solución de TBST a temperatura ambiente. Invierta la placa entre lavados sobre una toalla de papel para eliminar el líquido de lavado residual.
- 14.15. Agregue 100 µl de tampón de enjuague SSPE/SDS calentado (56 °C) a cada pozo.
- 14.16. Incube la placa a 56 °C durante 10 minutos.
- 14.17. Durante el período de incubación, prepare soluciones de trabajo de los fragmentos de antfluoresceína-AP conjugada con Fab (1 µl de la solución madre en 10 ml de tampón de dilución de anticuerpos).

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 8 de</b> 16

- 14.18. Vacíe el plato en el fregadero. Enjuague el pozo seis veces con TBST. Invierta la placa entre lavados sobre una toalla de papel para eliminar el líquido de lavado residual.
- 14.19. Agregue 50 µl de los fragmentos de antilfluoresceína-AP conjugada con Fab diluidos a cada pozo.
- 14.20. Incube la placa a los 37 °C durante 15 minutos.
- 14.21. Durante el período de incubación, prepare las soluciones de trabajo del sistema de detección BluePhos mezclando volúmenes iguales de solución A y solución B en un tubo de 15 ml. Úselo dentro de los 30 minutos posteriores a la mezcla. Necesita 10 ml de la mezcla para una placa completa.
- 14.22. Vacíe el plato en el fregadero. Enjuague el pozo seis veces con la solución de TBST a temperatura ambiente. Invierta la placa entre lavados sobre una toalla de papel para eliminar el líquido de lavado residual.
- 14.23. Agregue 100 µl de solución BluePhos recién mezclada a cada pozo. Dé golpecitos suaves para mezclar. Incube a temperatura ambiente durante 20 a 30 min. Comenzará a aparecer el color azul.
- 14.24. Diluya una parte de la solución quelante AP con 9 partes de agua de alta calidad para hacer una solución quelante 1X a temperatura ambiente.
- 14.25. Para un placa: 1 ml de solución quelante AP + 9 ml H<sub>2</sub>O.
- 14.26. Agregue 100 µl de solución quelante AP a cada pozo para detener el desarrollo del color en el momento deseado.
- 14.27. Lea placas a 650 nm.

## **15. Análisis/Cálculos**

- 15.1. Calcule la media de los diez pozos de control negativo y determine la desviación estándar de los controles negativos. Agregue un valor igual a tres desviaciones estándar (DE) a la media de los pozos de control negativos.
- 15.2. Utilizamos dos puntos de corte diferentes para el ensayo dependiendo de cuál sea la media más 3 DE de los negativos. Si este valor es superior a 0.1, utilice la media más 3 DE como punto de corte. Si está por debajo de 0.1, establezca el límite en 0.1. La razón de esto es que a medida que realiza el ensayo, su consistencia mejorará y los pozos en blanco comenzarán a mostrar muy poca variación. La principal fuente de variación que se ve cuando esto sucede surge de los antecedentes aportados por las propias muestras de ADN y no de la variación en el ensayo. Si obtiene blancos bajos muy ajustados, el

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 9 de 16

punto de corte no será suficiente para tener en cuenta esta fuente subyacente de variación y, calificará varios pozos como falsos positivos. Sin embargo, esta variación subyacente nunca supera 0.1, por lo que 0.1 es el límite a utilizar en esta situación.

- 15.3. Cualquier pozo con un valor de OD por debajo del punto de corte se califica como negativo y cualquier pozo con un valor por encima del punto de corte se califica como un supuesto positivo. Cuando se detecte un supuesto positivo, repita todo el ensayo para las muestras positivas supuestas, comenzando con una nueva reacción de PCR. Cualquier muestra que supere el punto de corte, en dos PCR independientes, se califica como positiva confirmada.

**16. Valores de referencia/Valores de alerta**

No aplicable.

**17. Interpretación de los resultados**

**18. Análisis de datos de placas experimentales:**

Calcule la media de los diez pozos de control negativo y determine la desviación estándar de los controles negativos. Agregue un valor igual a tres desviaciones estándar a la media de los pozos de control negativos.

Utilizamos dos puntos de corte diferentes para el ensayo dependiendo de cuál sea la media más 3 DE de los negativos. Si este valor es superior a 0.1, utilice la media más 3 DE como punto de corte. Si está por debajo de 0.1, establezca el límite en 0.1. La razón de esto es que a medida que realiza el ensayo, su consistencia mejorará y los pozos en blanco comenzarán a mostrar muy poca variación. La principal fuente de variación que se ve cuando esto sucede surge de los antecedentes aportados por las propias muestras de ADN y no de la variación en el ensayo. Si obtiene blancos bajos muy ajustados, el punto de corte no será suficiente para tener en cuenta esta fuente subyacente de variación, y calificará varios pozos como falsos positivos. Sin embargo, esta variación subyacente nunca supera 0.1, por lo que 0.1 es el límite a utilizar en esta situación.

Observe los valores de OD en los pozos del control positivo (A11 y A12). Ambos deben estar por encima del límite positivo como se determinó anteriormente. Es normal que el pozo que contiene el ADN de la mosca sea algo menor que el pozo sin el ADN de la mosca, pero ambos deben estar por encima del punto de corte para que el resultado en la placa sea válido. Cualquier pozo con un valor de OD por debajo del punto de corte se

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 10 de 16

califica como negativo y cualquier pocillo con un valor por encima del punto de corte se califica como un supuesto positivo. Cuando se detecte un supuesto positivo, repita todo el ensayo comenzando con una nueva reacción de PCR. Cualquier muestra que supere el punto de corte en dos PCR independientes se califica como O-150 positivo confirmado. Las muestras de ADN positivas confirmadas deben enviarse al laboratorio del Dr. Unnasch para una confirmación independiente.

Todos los pozos de control negativo y las extracciones simuladas de ADN deben tener valores de OD que estén en el nivel de fondo (es decir, menos de 0.1). Si alguno de los pozos de control negativos o extracciones simuladas tiene valores de OD positivos, es una indicación de que hay contaminación en algún lugar de su sistema. Si las reacciones simuladas son positivas y las reacciones de control negativas son todas negativas, esto apunta a contaminación en el proceso de extracción de ADN. Si un control negativo es positivo, es probable que haya contaminación en el proceso de PCR. Los problemas de contaminación son muy difíciles de diagnosticar y corregir. Póngase en contacto con el laboratorio de referencia para obtener asesoramiento sobre cómo identificar la fuente de contaminación y corregir el problema.

**19. Revisión y aprobación de resultados**

El personal que realizó el ensayo verificará y aprobará los datos de laboratorio. El supervisor del laboratorio revisará los resultados. El director del laboratorio revisará y aprobará los resultados.

**20. Presentación de informes de resultados; Pautas para la notificación**

Ingresa los resultados en el sistema de seguimiento de archivos designado por el laboratorio. Informe los resultados de acuerdo con los procedimientos de notificación de laboratorio al remitente.

**21. Retención y almacenamiento de muestras**

El ADN extraído y el ADN sobrante se etiquetarán adecuadamente y se almacenarán en el congelador designado a -70 °C durante un mínimo de tres años.

**22. Gestión de registros**

Las hojas de datos en las bitácoras de trabajo de todas las etapas del proceso se mantendrán en el laboratorio como se describe en sus Sistemas de gestión de calidad. Estos registros deberán estar fácilmente disponibles para auditoría o revisión en todo momento.

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
N.º de rev. USF-005	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 11 de 16

### 23. Referencias

- 23.1. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.<sup>a</sup> Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.<sup>a</sup> Edición | Portal de laboratorios de los CDC | CDC](#)). Consultado el 3 de abril de 2023

### 24. Anexos/Apéndices

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
N.º de rev. USF-005	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 12 de 16

### Apéndice 1

#### Preparación de TBS 10x:

1. Disuelva 30.2 g de Tris base y 43.8 g de NaCl en 350 ml de agua desionizada o destilada.
2. Ajuste el pH a 7.5 con HCl. Ajuste el volumen a 500 ml.
3. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 2

#### Preparación de 1 litro de TBST:

1. Mida y mezcle
  - a. 100 ml de TBS 10x
  - b. 0.5 ml de Tween 20
  - c. Agua destilada o desionizada a 1 litro (aprox. 900 ml)

Nota: el tampón Tween 20 es muy viscoso y puede ser difícil de pipetear con precisión. Para diluirlo, caliéntelo durante un corto período en un microondas o en la incubadora a 56 °C.

2. Conservar en botellas con atomizador
3. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 3

#### Preparación del tampón de recubrimiento:

1. Preparación de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mM.
  - a. 4.2 g de bicarbonato de sodio
  - b. 0.211 g de carbonato de sodio
  - c. Disolver para hacer un litro
2. Prepare tampón de recubrimiento fresco semanalmente ya que el pH cambia durante el almacenamiento.
3. Etiquete con una fecha de vencimiento de 1 semana y almacene a 4 °C

### Apéndice 4

#### Preparación del tampón de hibridación

Reactivo	Cantidad a añadir
SSPE 20X	120 ml
Denhardt's 10X	50 ml
N-lauril sarcosina al 1% (p/v)	50 ml
SDS 10 %	1 ml

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 13 de 16

agua destilada o desionizada	279 ml
------------------------------	--------

1. Prepare 500 ml de

solución matriz utilizando las siguientes soluciones:

- Etiquete, autoclave y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 5

#### Preparación de la sonda OVS2-Fl:

5' AATCTCAAAAAACGGGTACATA-fl 3'      donde fl = fluoresceína.

- Quando reciba esto, la hoja de especificaciones debe indicar la cantidad exacta que le enviaron en microgramos.
- Disuelva toda la cantidad en suficiente tampón de hibridación para obtener una solución matriz 100x de 10 µg/ml. Tome alícuotas de la solución matriz 100x en alícuotas de 55 µl cada una y almacene a -70 °C.
- Para preparar la solución de trabajo, retire una alícuota del congelador, descongele y agregue 5.45 ml de tampón de hibridación. Esto producirá 5.5 ml de solución de trabajo, suficiente para hacer una placa completa.
- Almacene cualquier solución de trabajo no utilizada a -20 °C y uso en el plazo de un mes.

### Apéndice 6

#### Preparación de SSPE 20X:

- Disuelva
  - 174 g de NaCl,
  - 27.6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,
  - 7.4 g de EDTA disódico
  - en 700 ml de agua destilada o desionizada.
- Ajuste el pH a 7.4 con NaOH.

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 14 de</b> 16

3. Lleve el volumen a 1 litro.
4. Almacene a temperatura ambiente.

### **Apéndice 7**

#### Preparación de Denhardt's 10X

1. Pese 0.2 g de cada uno de los tres ingredientes a continuación y disuélvalos en 100 ml de agua destilada o desionizada.
2. albúmina sérica bovina al 0.2 % (p/v)
3. polivinilpirrolidona al 0.2 % (p/v)
4. Ficoll 400 al 0.2 % (p/v)
5. Etiquete y almacene a -20 °C

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
N.º de rev. USF-005	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 15 de 16

### Apéndice 8

#### Preparación de N-lauril sarcosina al 1 %

1. Disuelva 1 g de N-lauril en 80 ml de agua destilada o desionizada.
2. Ajuste el volumen a 100 ml.
3. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 9

#### Preparación de FDS al 10 %:

1. El SDS es muy ligero y los cristales son muy irritantes si se inhalan. Use una mascarilla para polvo cuando lo pese.
2. Disuelva 100 g de SDS en 800 ml de agua destilada o desionizada.
3. Ajuste el volumen final a 1 litro.
4. Etiquete y almacene a temperatura ambiente.

### Apéndice 10

#### Preparación del tampón de enjuague SSPE/SDS:

1. Medir y mezclar:
  - a. 5 ml de SSPE 20X
  - b. 1 ml de SDS 10%
  - c. 94 ml de agua destilada o desionizada
2. Etiquete y almacene a 56 °C.

### Apéndice 11

#### Preparación dle tampón de dilución de anticuerpos

1. Mida y mezcle lo siguiente:

Reactivo	Cantidad a añadir
NaCl 4M	10 ml
Tris HCl 1 M (pH 7.5)	10 ml
BSA	0.5 g
agua destilada o desionizada.	80 ml

2. Etiquete y almacene a -20 °C

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Detección basada en ELISA de productos de PCR de O-150</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-005	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página</b> 16 de 16

**25. Historial de revisiones**

<b>N.º de rev.</b>	<b>N.º de DCR</b>	<b>Cambios realizados en el documento</b>	<b>Fecha</b>
Nuevo		Nuevo documento	

**26. Firmas de aprobación**

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Autor

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Revisor de SME

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Laboratorio de Referencia de  
Oncocercosis de la USF

\_\_\_\_\_  
Fecha

5. USF-006 *Protocolo de ELISA para E. coli* – Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<p align="center"><b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b>  <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b></p>			
N.º de rev. USF-006	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 1 de 11

## 1. Propósito

Este documento describe la detección de anticuerpos contra la *Escherichia coli* en muestras de sangre seca recolectadas de niños menores de 15 años. La determinación de si una muestra es positiva se basa en la prueba de ELISA.

## 2. Alcance

Este procedimiento aplica para los laboratorios que pertenecen a la Red de Diagnóstico de Laboratorios de Oncocercosis administrada por el USFCC.

Para que los resultados del ensayo de Ov16 por ELISA sean válidos, las manchas de sangre seca (DBS) que se hayan recogido deben contener anticuerpos activos. Los DBS son estables durante períodos relativamente largos (por ejemplo, días) a temperatura ambiente, pero son muy susceptibles a la degradación si no se mantienen completamente secos. Por lo tanto, antes de comenzar el análisis de la DBS para los anticuerpos Ov16, es necesario determinar si la DBS aún contiene anticuerpos activos. Para ello, primero se analiza una selección aleatoria de DBS para detectar la presencia de anticuerpos contra la *Escherichia coli*. La *E. coli* es una bacteria que se encuentra universalmente en nuestros intestinos y es una fuente común de infecciones (de heridas o del tracto urinario), ya que las heces contienen grandes cantidades de *E. coli*. Por lo tanto, los anticuerpos contra la *E. coli* son casi universales. Este protocolo describe cómo detectar *E. coli* anticuerpos en las manchas de sangre eluidas.

Si este protocolo se va a ejecutar en un laboratorio que también está ejecutando el ELISA de PCR de O150 para detectar la presencia de L3 de *O. volvulus* en vectores, el Ov16 por ELISA debe realizarse en el área post-PCR donde se encuentra el lector de placas ELISA. Pipetas post PCR se pueden compartir entre el PCR ELISA y este protocolo ELISA. Sin embargo, es importante que usted **NO** trabaje en el área de pre PCR/PCR después de haber realizado un Ov16 por ELISA, ya que correrá el riesgo de contaminación al pasar del área de post PCR al área de pre PCR/PCR, como se describe en el protocolo O150 PCR ELISA.

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b>			
N.º de rev. USF-006	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 2 de 11

### 3. Documentos relacionados

Título	Número de control del documento
Manual de Aseguramiento Externo de la Calidad	USF-001
Protocolo de ELISA para Ov16 (versión OEPA) – Detección de anticuerpos contra <i>O. volvulus</i>	USF-002

### 4. Responsabilidad

Cargo	Tareas
Personal de pruebas de laboratorio	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumple con las políticas y procedimientos del laboratorio</li> <li>• Leer y comprender el protocolo</li> <li>• Realizar pruebas de acuerdo con el protocolo</li> <li>• Registrar los resultados según el protocolo</li> </ul>
Supervisor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollar e implementar políticas, procesos y procedimientos para garantizar que todas las funciones críticas del laboratorio se lleven a cabo en condiciones controladas</li> <li>• Asegurarse de que todo el personal de pruebas esté capacitado y bien informado.</li> <li>• Revisar y aprobar los resultados</li> </ul>

### 5. Definiciones

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

USF: Universidad del Sur de Florida

MDP: Programa de Donación Mectizán

USFCC: Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF

### 6. Equipo/Materiales (si corresponde)

Artículo
Congelador a -70 °C
Congelador a -20 °C
Refrigerador a 4 °C
Lector de placas ELISA capaz de leer a 405 nm

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b>			
N.º de rev. USF-006	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 3 de 11

Balanza de carga superior con una exactitud de 10 mg
Balanza analítica con una precisión de 0.1 mg
Medidor de pH
Mezclador de vórtice
Placa de agitación magnética y agitadores
Micropipetas ajustables de 1-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl
Micropipeta multicanal de 20-200 ul (8 o 12 canales)
Frascos rociadores tamaño 500 ml
Perforadora de ¼"

## 7. Reactivos y suministros

Artículo	Proveedor recomendado	Número de catálogo
Guantes de látex o nitrilo	Cualquiera	
Puntas de barrera contra aerosoles (20 ul, 200 ul, 1000 ul)	Cualquiera	
Selladores de placas	Cualquiera o Fisher	3501
Bolsas de plástico con cierre hermético de un litro	Cualquiera	
Placas de poliestireno de 96 pozos para elución de DBS	Cualquiera o Fisher	3370
Placas de fondo plano Immulon 2HB	Fisher	3455
Toallas de papel	Cualquiera (local)	
Depósitos de reactivos de 50 ml	Cualquiera	
Tampón de recubrimiento	Preparado en laboratorio	
Antígeno de <i>E. coli</i>	USFCC	
Antígeno GST	USFCC	
IgG antihumano de cabra conjugada con AP	Jackson Immuno Research	109-055-003
Solución salina tamponada con fosfato (PBS)	Preparado en laboratorio	
PBST	Preparado en laboratorio	
PBST-BSA	Preparado en laboratorio	
Kit de sustrato y tampón pNPP	Fisher	37620
Cloruro de sodio (NaCl)	Cualquiera	
Cloruro de potasio (KCl)	Cualquiera	

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA <i>para E. coli</i></b> <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-006	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 4 de</b> 11

Fosfato de potasio monobásico (KH) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Cualquiera	
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Cualquiera	
Tween 20	Cualquiera	
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	Cualquiera	
Albúmina sérica bovina, fracción V (BSA)	Sigma recomendado	
Hidróxido de sodio (NaOH)	Cualquiera (obtenido localmente)	
Solución quelante	Preparada en laboratorio	

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-006	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 5 de</b> 11

**8. Suministros, otros materiales**

Artículo
No corresponde

**9. Precauciones de seguridad**

- 9.1. Los procedimientos deben realizarse de conformidad con todas las políticas y procedimientos de seguridad institucionales, de acuerdo con Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.ª Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.ª Edición | Portal de laboratorio de los CDC | CDC](#)).
- 9.2. **Equipo de protección personal:** se debe usar protección para los ojos, guantes y bata de laboratorio en todo momento
- 9.3. **Requisitos de contención:** se aplican precauciones universales.
- 9.4. **Respuesta a derrames:** N/C

**10. Obtención, almacenamiento, conservación y transporte de muestras** Las muestras serán manchas de sangre seca, separadas individualmente, almacenadas en bolsas de plástico con desecante de sílice y un indicador de color de humedad.

- 10.1. Todos los lotes de DBS que se vayan a probar deben cumplir con los criterios de la prueba de aceptación:
- 10.2. Empaque adecuado de la bolsa: bolsa intacta, completamente etiquetada, debidamente sellada, presencia de desecante con indicador de color que representa seco, indicador de humedad de la tarjeta que muestra <20 % de humedad.
- 10.3. Cada bolsa del lote se identifica correctamente con una hoja de cálculo adjunta para identificar todas las muestras.
- 10.4. Si no se cumplen estos requisitos, las bolsas no deben procesarse más para realizar pruebas. Se notificará al remitente y se le devolverán las bolsas.

**11. Registro de la muestra** El laboratorio de pruebas introduce la información del lote en un documento maestro de Excel "Ov16 ELISA". A cada lote de muestras se le asignará un identificador único que permite el seguimiento de muestras y lotes.

**12. Control de calidad**

Controles positivos y negativos según lo dispuesto por la USFCC

**13. Flujo de trabajo o tabla de procesos (opcional)**

<b>USFCC</b>	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-006	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 6 de</b> 11

13.1. Indicar los números de edificio y sala donde se procesarán las muestras, y se leerá el ELISA.

13.2. Indique los números de edificio y sala donde se ubicarán los congeladores.

#### **14. Procedimiento**

14.1. Elija aleatoriamente una selección de DBS para realizar la prueba del anticuerpo de *E. coli*. Debe elegir el 10 % del número total de muestras de una bolsa de recolección determinada que se entregó al laboratorio, o al menos 10 DBS si hay menos de 100 DBS en una bolsa de recolección. Cada placa para ELISA será capaz de analizar 40 muestras en este protocolo (ver más abajo).

14.2. Perfore una mancha de las muestras de sangre seca recolectadas en los papeles de filtro con una perforadora de papel estándar de 1/4". Usando su mapa, coloque los punzones duplicados de las manchas de sangre en los pozos de una placa de elución de DBS de 96 pozos. Agregue 200 µl de PBST-BSA a cada muestra. Empuje los punzones hasta el fondo del pozo y luego mezcle 10 veces pipeteando. Cubra las placas con un sellador de placas e incube a 4 °C durante la noche. Almacene las muestras de suero eluidas a corto plazo (hasta dos semanas) a 4 °C y a largo plazo a -20 °C. Minimice el número de ciclos de congelación y descongelación.

14.3. Prepare dos soluciones de antígenos para recubrir la placa: una solución de antígeno de *E. coli* de 2 µg/ml en el tampón de recubrimiento y, el segundo que contenga 2 µg/ml de BSA.

14.4. Siguiendo el mapa a continuación, agregue 100 µl de cada solución de recubrimiento como se indica a los pozos de una placa Immulon II HB, recubriendo las columnas 1-6 con BSA y 7-12 con antígeno de *E. coli*. Selle la placa e incube a 4 °C durante la noche.

	<b>BSA</b>						<b><i>E. coli</i></b>					
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	BLK	S1	S9	S17	S25	S33	BLK	S1	S9	S17	S25	S33
<b>B</b>	BLK	S2	S10	S18	S26	S34	BLK	S2	S10	S18	S26	S34
<b>C</b>	BLK	S3	S11	S19	S27	S35	BLK	S3	S11	S19	S27	S35
<b>D</b>	BLK	S4	S12	S20	S28	S36	BLK	S4	S12	S20	S28	S36
<b>E</b>	BLK	S5	S13	S21	S29	S37	BLK	S5	S13	S21	S29	S37
<b>F</b>	BLK	S6	S14	S22	S30	S38	BLK	S6	S14	S22	S30	S38
<b>G</b>	BLK	S7	S15	S23	S31	S39	BLK	S7	S15	S23	S31	S39
<b>H</b>	BLK	S8	S16	S24	S32	S40	BLK	S8	S16	S24	S32	S40

USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> – Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras			
N.º de rev. USF-006	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 7 de 11

S= DBS (muestra)

BLK= blanco (no se añadirá sangre eluida)

- 14.5. Enjuague 4 veces con PBST, usando una botella con atomizador. No seque entre enjuagues. Seque la placa en una pila de toallas de papel después del último lavado.
- 14.6. Agregue 100 µl de PBST-BSA a cada pozo e incube a 4 °C durante 1 hora.
- 14.7. Después de la incubación, retire la placa del refrigerador y deseche el tampón. No enjuague la placa. Coloque en una pila de papel absorbente para secar.
- 14.8. Agregue 50 µl de DBS eluida por duplicado a cada pozo de acuerdo con el mapa. Para los blancos, agregue PBST-BSA.
- 14.9. Selle la placa e incube a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 14.10. Enjuague las placas cuatro veces con PBST. Coloque la placa sobre papel absorbente para secar después del enjuague final.
- 14.11. Añada 50 µl de IgG antihumano de cabra conjugada con AP diluida 1:5,000 en PBST a cada pozo. Selle la placa e incube la placa a temperatura ambiente durante una hora.
- 14.12. Enjuague las placas cuatro veces con PBST. Coloque la placa sobre papel absorbente para secar después del enjuague final.
- 14.13. Prepare la solución de pNPP con el tampón de sustrato disolviendo 1 tableta en 5 ml de tampón de sustrato 1X. Añada 50 µl a cada pozo. Incube a temperatura ambiente, cubierto con papel de aluminio o en un cajón, durante 20 a 30 minutos.
- 14.14. Agregue 25 µl de solución de parada (NaOH 3 M) a cada pozo y lea la placa inmediatamente a 405 nm.

#### 15. Control de calidad

Los pozos en blanco y los pozos recubiertos con BSA deben tener valores de OD de 0.1 o menos.

#### 16. Análisis/Cálculos

Una muestra se puntúa como positiva para anticuerpos de *E. coli* si el OD en el pozo recubierto de *E. coli* es 5 veces o más que el OD observado en el pozo recubierto de BSA correspondiente.

**Al menos el 70 % de las muestras de una bolsa de recolección deben ser positivas para anticuerpos de *E. coli*.** Un menor nivel de reactividad a *E. coli* sugiere que la DBS se

USFCC	<b>Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF</b>		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> <b>– Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras</b>			
<b>N.º de rev.</b> USF-006	<b>N.º de rev.</b> Nuevo	<b>Fecha de entrada en vigor:</b> 05/15/2023	<b>Página 8 de</b> 11

echó a perder y, que todas las muestras de dicha bolsa no deben utilizarse en el ELISA de Ov16. Se notificará al remitente y se le devolverá la bolsa con su contenido.

- 17. Valores de referencia/Valores de alerta**  
No aplicable.
- 18. Revisión y aprobación de resultados**  
El supervisor y el director del laboratorio evaluarán los resultados de laboratorio.
- 19. Presentación de informes de resultados; Pautas para la notificación**  
Ingresa los resultados en el sistema de seguimiento de archivos designado por el laboratorio. Las bolsas que pasen la prueba podrán examinarse posteriormente. Los resultados de las bolsas defectuosas se procesarán según los procedimientos de notificación del laboratorio al remitente.
- 20. Retención y almacenamiento de muestras**  
El DBS eluida y el DBS sobrante se etiquetarán correctamente y se almacenarán en el congelador designado.
- 21. Gestión de registros**  
Las hojas de datos en la bitácora de trabajo de todas las etapas del proceso se mantendrán en el laboratorio como se describe en sus Sistemas de gestión de calidad. Estos registros deberán estar fácilmente disponibles para auditoría o revisión en todo momento.
- 22. Referencias**
  - 22.1. CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6.<sup>a</sup> Edición ([Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories \(BMBL\) 6.<sup>a</sup> Edición | Portal de laboratorios de los CDC | CDC](#)). Consultado el 3 de abril de 2023
- 23. Anexos/Apéndices**



USFCC	Laboratorio de Referencia de Oncocercosis de la USF		
<b>Protocolo de ELISA para <i>E. coli</i></b> – Detección de anticuerpos para la aceptación de muestras			
N.º de rev. USF-006	N.º de rev. Nuevo	Fecha de entrada en vigor: 05/15/2023	Página 10 de 11

1. Disuelva 5 g de BSA en 100 ml de PBST.
2. La etiqueta debe incluir la fecha de preparación y de vencimiento.
3. Almacene a 4 °C.

Solución quelante (NaOH 3M)

1. Disuelva 12 g de NaOH en 80 ml de agua desionizada o destilada.
2. Ajuste el volumen final a 100 ml.
3. La etiqueta debe incluir la fecha de preparación y de vencimiento.
4. Almacene a temperatura ambiente.

**24. Historial de revisiones**

N.º de rev.	N.º de DCR	Cambios realizados en el documento	Fecha
Nuevo		Nuevo documento	

**25. Firmas de aprobación**

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Autor Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_  
Revisor de SME Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre y cargo en letra de imprenta

Aprobado  
por:

\_\_\_\_\_

