

Garantia de Qualidade Externa

Manual de Laboratório e POPs
Métodos laboratoriais para eliminação da oncocercose
Versão: Maio de 2023

Colaboradores

Thomas R. Unnasch

Hassan K. Hassan

Revisão e edição

Vitaliano Cama

Apoio financeiro

The Carter Center

Programa de doação Mectizan

NOTA: esses protocolos serão atualizados periodicamente. As versões mais recentes podem ser encontradas em <https://health.usf.edu/publichealth/onchocerciasis>

Índice

Manual de Laboratório e POPS	1
Acrônimos.....	3
Lista de POPS	4
1. USF-002 Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>	5
2. USF-003 Extração de DNA de simuliídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>	14
3. USF-004 Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>	14
4. USF-005 Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150	13
5. USF-006 Protocolo ELISA para <i>E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras	16

Acrônimos

CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
DBS	Manchas de sangue seco
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
CE	Controle externo
EQA	Garantia de qualidade externa
EQAL	Laboratório externo de avaliação da qualidade
IC	Controle interno
IQC	Controle de qualidade interno
MDP	Programa de doação Mectizan
MoH	Ministério da Saúde
NEC	Controle de extração negativo
NTC	Controle de modelo negativo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEC	Controle de extração positivo
EPC	Equipamento de proteção pessoal
PTC	Controle de modelo positivo
QA	Garantia de qualidade
QC	Controle de qualidade
QI	Melhoria de qualidade
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SME	Especialista no assunto
POP	Procedimento Operacional Padrão
USF	University of South Florida
USFCC	USF Centro Colaborador da OMS para Diagnóstico de Oncocercose
OMS	Organização Mundial da Saúde

Lista de POPS

1. USF-002 Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra *O. volvulus*
2. USF-003 Extração de DNA de simúlideos *Simulium* para detectar *Onchocerca volvulus*
3. USF-004 Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de *Onchocerca volvulus*
4. USF-005 Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150
5. USF-006 Protocolo Elisa para *E. Coli* – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras

1. USF-002 Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra *O. volvulus*

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 1 de 13

1. Objetivo

Este documento descreve a detecção de anticorpos anti-*Onchocerca volvulus* em amostras de sangue seco coletadas de crianças menores de 15 anos de idade. A determinação se uma amostra é positiva é baseada no teste ELISA.

2. Escopo

Este procedimento aplica-se aos laboratórios que pertencem à Rede de Diagnóstico Laboratorial de Oncocercose gerida pelo Laboratório de Referência de Oncocercose da USF.

A prevalência de anticorpos anti-Ov16 em crianças de 5 a 10 anos é uma das duas métricas usadas recomendadas pela OMS para determinar se a transmissão foi suprimida e, portanto, os tratamentos podem ser interrompidos. Esta também é uma métrica suplementar recomendada pela OMS para a verificação da eliminação caso alguma evidência de transmissão contínua seja detectada nas pesquisas entomológicas pós-MDA. Ov16 é um antígeno de 16 kDa encontrado em todos os estágios do ciclo de vida de *Onchocerca volvulus*. Os anticorpos da classe IgG4 contra esse antígeno têm sido um indicador altamente específico de exposição ao parasita. O protocolo ELISA é o utilizado com sucesso pelos países da América Latina que verificaram a eliminação da oncocercose. Também é amplamente utilizado na África.

Se o protocolo for executado em um laboratório que também esteja executando o O150 PCR-ELISA para detectar a presença de *O. volvulus* L3 em vetores, o ELISA Ov16 deve ser realizado na área pós-PCR na qual o leitor de placas ELISA está localizado. Pipetadores pós-PCR podem ser compartilhados entre os protocolos PCR-ELISA e ELISA. No entanto, é importante NÃO trabalhar na área de pré-PCR/PCR depois de ter feito um ELISA Ov16, pois haverá risco de contaminação ao passar da área de pós-PCR para a área de pré-PCR/PCR, conforme discutido no protocolo O150 PCR-ELISA.

Para que os resultados desse ensaio sejam válidos, as manchas de sangue seco (DBS) que foram coletadas devem conter anticorpos ativos. Os DBS são estáveis por períodos relativamente longos (por exemplo, dias) à temperatura ambiente, mas são muito suscetíveis à degradação se não são mantidos completamente secos. Desta maneira, antes de iniciar a análise de DBS para anticorpos Ov16, é necessário determinar se o DBS ainda contém anticorpos ativos. Faça isso testando primeiro uma seleção aleatória

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 2 de 13

de DBS para a presença de anticorpos contra *Escherichia coli*. Consulte como fazer isso no protocolo que acompanha.

3. Documentos relacionados

Título	Número de controle do documento
Manual externo de garantia de qualidade	USF-001
<i>Protocolo Elisa para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras	USF-006

4. Responsabilidade

Posição	Deveres
Equipe técnica do laboratório	- Estar em conformidade com as políticas e procedimentos do laboratório - Ler e entender o protocolo - Realizar os ensaios de acordo com o protocolo - Registrar os resultados de acordo com o protocolo
Supervisor	- Desenvolver e implementar políticas, processos e procedimentos para garantir que todas as funções críticas do laboratório sejam realizadas sob condições controladas - Certificar-se de que toda a equipe técnica esteja treinada e bem instruída - Revisar e aprovar resultados

5. Definições

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

USF: University of South Florida

MDP: Programa de doação Mectizan

USFCC: Laboratório de Referência de Oncocercose da USF

6. Equipamentos/Materiais (se aplicável)

Item
Freezer ultrabaixa temperatura -70 °C

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>			
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 3 de 13

Congelador -20 °C
Refrigerador 4 °C
Leitor de placas ELISA capaz de ler a 405 nm
Balança de carga superior com precisão de 10 mg
Balança analítica com precisão de 0,1 mg
Medidor de pH
Misturador de vórtice
Placa de agitação magnética e agitadores
Micropipetas ajustáveis de 1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL
Micropipeta multicanal de 20-200µL (8 ou 12 canais)
Garrafas de esguicho de 500 ml
Perfuradores de ¼ polegada

7. Reagentes e suprimentos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Luvas de látex ou nitrilo	Qualquer fornecedor	
Ponteiras de barreira de aerossol (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Qualquer fornecedor	
Filme selador de placas	Qualquer fornecedor ou Fisher	3501
Sacos de plástico Ziplock de um litro	Qualquer fornecedor	
Placas de poliestireno de 96 poços para eluição DBS	Qualquer fornecedor ou Fisher	3370
Placas de fundo plano Immunolon 2HB	Fischer	3455
Toalhas de papel	Qualquer fornecedor (local)	
Reservatórios de reagentes de 50 ml	Qualquer fornecedor	
Tampão de revestimento	Preparado em laboratório	
Antígeno Ov16-GST	USFCC	
Antígeno GST	USFCC	
Anticorpo monoclonal Ov16 IgG4 humanizado (MCAB)	BioRad	
anticorpo anti-IgG ₄ humano conjugado com biotina	Sigma Invitrogen	Sigma B3648 Invitrogen A10663

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 4 de 13

Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Preparado em laboratório	
PBST	Preparado em laboratório	
PBST-BSA	Preparado em laboratório	
Conjugado de estreptavidina-AP	Fischer	434322
Kit de substrato e tampão de pNPP	Fischer	37620
Cloreto de sódio (NaCl)	Qualquer fornecedor	
Cloreto de potássio (KCl)	Qualquer fornecedor	
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Qualquer fornecedor	
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Qualquer fornecedor	
Tween 20	Qualquer fornecedor	
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)		
Albumina de soro bovino, fração V (BSA)	Qualquer fornecedor ou Genessee	2Genessee 5-529
Hidróxido de sódio (NaOH)	Qualquer fornecedor (obtido localmente)	
Solução de parada	Preparado em laboratório	

8. Suprimentos, outros materiais

Item
Água destilada

9. Precauções de segurança

- 9.1. Os procedimentos devem ser realizados em conformidade com todas as políticas e procedimentos de segurança institucionais, em conformidade com a 6ª edição do documento orientativo - *Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC* ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)).
- 9.2. **Equipamento de proteção pessoal:** proteção para os olhos, luvas e jaleco devem ser usados o tempo todo
- 9.3. **Requisitos de contenção:** aplicam-se precauções universais
- 9.4. **Resposta a derramamento:** n/a
10. **Coleta, armazenamento, preservação e transporte de amostras:** os espécimes serão manchas de sangue seco, separadas individualmente, armazenadas em sacos plásticos com dessecante de sílica e um indicador de cor de umidade.
- 10.1. Todas as amostras de DBS a serem testadas deverão estar em conformidade com os critérios de teste de aceitação:
- 10.2. Embalagem adequada

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 5 de 13	

10.3. Identificação apropriada em uma planilha de acompanhamento para identificar todas as amostras

10.4. Aprovação na triagem de *E. Coli* em lote

11. **Obtenção de espécimes:** o laboratório deverá inserir as informações do lote em um documento mestre do Excel "Ov16 ELISA". Cada lote de amostras receberá um identificador exclusivo que permite o rastreamento de amostras e lotes.

12. Controle de qualidade

Controles positivos e negativos fornecidos pela USFCC

13. Tabela de fluxo de trabalho ou processo (opcional)

13.1. Indique a localização (número do prédio e da sala) onde as amostras serão processadas e onde o ELISA será lido.

13.2. Indique a localização (número do prédio e da sala) onde os freezers estarão localizados.

14. Procedimento

14.1.

Etapa	Ação
1	Prepare um mapa de placas usando o seguinte modelo:

STD 640	STD 640	Em branco	Em branco	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31
STD 320	STD 320	Em branco	Em branco	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

STD = Padrões

Em branco = poços com PBST 5% BSA adicionado no lugar do soro

S1-S38 = amostras de soro eluído do DBS (em duplicata)

14.2 Como fazer e eluir punções DBS

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 6 de 13	

Etapa	Ação
1	Realize picotes duplicados das das amostras de sangue seco coletadas nos papéis de filtro, usando um furador padrão de papel de 6 mm. Usando seu mapa, coloque os picotes duplicados das manchas de sangue nos poços de amostra em uma placa de eluição DBS. Adicione 200 µl de PBST-BSA para cada amostra. Empurre os picotes para o fundo do poço e misture 10 vezes pipetando. Cubra as placas com um selador de placas e incube a 4°C durante a noite (<i>overnight</i>).
2	Armazene as amostras de sangue eluído a curto prazo (até duas semanas) a 4°C e longo prazo a -20°C. Minimize o número de ciclos de congelamento e descongelamento.
3	Placa sensibilizada com antígeno: dilua o antígeno Ov16-GST a 2,0 ug/ml no tampão de revestimento. Adicione 100 µL a cada poço de uma placa Immunolon 2HB. Coloque a placa em um saco ziplock e incube durante a noite a 4 °C (<i>overnight</i>).
4	Lave 4 vezes com PBST usando uma pisseta. Não seque entre as lavagens. Seque a placa em uma pilha de toalhas de papel após a última lavagem.
5	Adicione 100 µl de PBST-BSA, coloque a placa em um saco ziplock e incube a 4°C por pelo menos 1 hora.
6	Durante a incubação da etapa 4, prepare 250µL de 250 ng/ml do McAb em PBST-5% BSA. Isso equivale a 640 unidades (por 50µL). Prepare uma série de sete diluições duplas do MCAB. Comece com 125 µL do estoque de 250 ng/ml e adicione a 125 µL de PBST-5% BSA. Essa será uma solução de 125 ng/ml ou 320 unidades/50 µL. Continue fazendo as diluições adicionais até obter um total de 8 em série, que variam de 640 unidades/50 µL a 5 unidades/50 µL. Reserve 250 µL de PBST-5% BSA para usar como branco.
7	Após a incubação da etapa 4, esvazie o PBST-BSA na pia e seque a placa em uma pilha de toalhas de papel. Não lave.
8	Usando seu mapa (descrito no item 14.1), acrescente 50µl de cada amostra de soro (diluição de controle positivo, amostras em branco e amostras eluídas) para os poços correspondentes no mapa de placas. Coloque a placa em

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 7 de 13

	um saco ziplock e incube em temperatura ambiente por 2 horas.
9	Lave 4 vezes com PBST usando uma pisseta. Seque a placa após a primeira lavagem e, em seguida, execute as três lavagens restantes sem secar a placa entre as etapas de lavagem. Seque a placa após lavar pela 4ª vez.
10	10 minutos antes do fim da última incubação, prepare o conjugado. Dilua o anticorpo anti-IgG ₄ humano conjugado com biotina Invitrogen na proporção 1:1000 em PBST. Se estiver usando o conjugado da marca Sigma, dilua na proporção 1:10.000. Adicione 50µl do conjugado diluído em todos os poços. Para uma placa cheia, será necessário 5,5 ml da solução de trabalho. Coloque a placa em um saco ziplock e incube em temperatura ambiente por 1 hora.
11	Lave 4 vezes com PBST usando uma pisseta. Não seque entre as lavagens. Mas seque a placa após a última lavagem.
12	10 minutos antes do fim da última incubação, prepare a estreptavidina-AP. Dilua a estreptavidina-AP na proporção 1:2000 em PBST. Para uma placa, adicione 2,75µL de estreptavidina-AP a 5,5 ml de PBST. Adicione 50µl em todos os poços, cubra a placa e incube em temperatura ambiente por 1 hora.
13	Lave 4 vezes com PBST usando uma pisseta. Não seque entre as lavagens. Seque a placa após a última lavagem.
14	5 minutos antes do término do período de incubação, ligue o leitor de placas ELISA e configure-o para ler a 405 nm. Prepare a solução pNPP com o tampão de substrato dissolvendo 1 comprimido em 5 ml de tampão de substrato 1X. Adicione 50µl para cada poço.
15	Caso o leitor de placas faça a leitura da placa inteira de uma vez, leia a placa até que o padrão 640 esteja em torno de OD 1,5.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 8 de 13

16	Caso o leitor de placas faça a leitura poço a poço(BioTek), leia apenas os dois poços do padrão 640 a cada minuto e agite a placa entre as leituras. Quando elas estiverem em torno de 0,9 OD, comece a ler com mais frequência. Quando atingir OD 1,1, pare a reação adicionando 25 µl de 3M NaOH para cada poço. Agite as placas para interromper a reação. Incube a placa por 5 minutos em temperatura ambiente e leia a 405 nm.
-----------	---

15. Controle de qualidade interno

A análise a seguir tem como pressuposto que houve confirmação de que as amostras DBS foram armazenadas de maneira adequada e contém anticorpos ativos. A menos que isso seja feito, os resultados do ELISA Ov16 não podem ser validados.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 9 de 13

Análises/cálculos

Os resultados obtidos através do ELISA-Ov16 devem ser analisados usando os seguintes critérios; se a execução do ensaio ELISA não atender a esses critérios, ela deverá ser repetida.

São atribuídas as seguintes unidades arbitrárias às diluições da curva padrão,:

Diluição	Unidades
250 ng/ml	640
125 ng/ml	320
62,5 ng/ml	160
31ng/ml	80
15,5 ng/ml	40
8 ng/ml	20
4 ng/ml	10
2 ng/ml	5

Um gráfico de OD versus unidades deve ser linear na faixa de 10-160 unidades, com um valor de r^2 para a linha de $>0,95$. A faixa dinâmica para a parte linear da curva deve ser de pelo menos 4 vezes, ou seja, o valor OD para os 160 pontos unitários deve ser pelo menos quatro vezes maior que os 10 pontos unitários. Os 40 pontos unitários devem ser pelo menos duas vezes os ODs em branco. Os poços duplicados na curva padrão devem estar numa faixa de 10% um do outro.

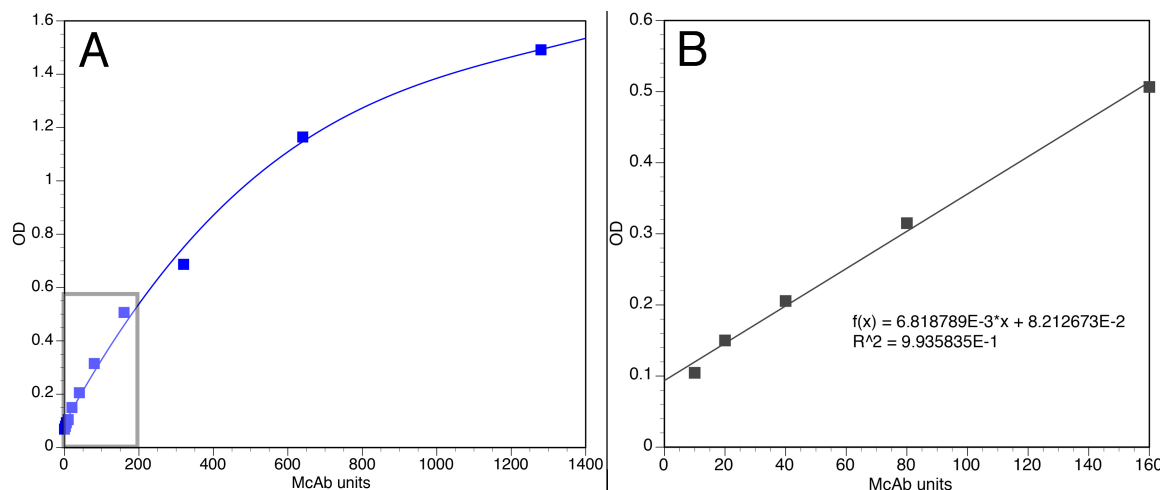


Figura 1: Um exemplo de uma curva padrão aprovado nos padrões de QC. Painel A: Gráfico de todos os valores OD versus unidades McAb. Observe que o OD para o ponto de 640 unidades é de aproximadamente 1,1, indicando que o ensaio foi encerrado em um momento apropriado. A área em caixa indica a área linear da curva. Painel B: Uma

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 10 de 13

replotagem da área linear da curva. Observe que o valor de r^2 é 0,993, que é maior que 0,95. O valor OD do ponto de 160 unidades é 0,51, que é mais de quatro vezes o valor do ponto de 10 unidades (0,10).

16. Valores de referência/valores de alerta

O ponto de corte é definido em 40 unidades arbitrárias.

17. Interpretação dos resultados

Amostras com valores iguais ou superiores a 40 unidades arbitrárias são consideradas positivas. Amostras com menos de 40 unidades arbitrárias são consideradas negativas. Qualquer amostra para a qual ambas as amostras duplicadas forneçam uma leitura igual ou superior a este ponto é considerada putativamente positiva. Se a amostra for supostamente positiva, repita o ensaio. As amostras com valores de OD em ambos os ensaios que são de pelo menos 40 unidades devem ser testadas da mesma maneira em poços sensibilizados com GST. Ao executar a placa GST, a primeira coluna deve ser revestida com Ov16, e a curva padrão deve ser executada normalmente. Sensibilize os poços restantes a serem testados com as amostras de soro apenas com GST. As amostras que apresentam um valor de OD superior a 40 unidades em ambos os ensaios quando testadas em relação a Ov16 e que resultam em OD correspondente a menos de 20 unidades quando testadas apenas contra GST são confirmadas positivas.

18. Revisão e aprovação de resultados

Os dados laboratoriais serão verificados e assinados pela equipe técnica que conduziu o ensaio. Os resultados serão então revisados pelo supervisor do laboratório. O diretor do laboratório analisará e aprovará os resultados.

19. Relatório de resultados; Diretrizes para notificação

Insira os resultados no sistema de rastreamento de arquivos designado pelo laboratório. Relate os resultados de acordo com os procedimentos de relatório de laboratório ao remetente.

20. Retenção e armazenamento de amostras

O DBS eluído e o DBS restante serão devidamente rotulados e armazenados no freezer designado.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 11 de 13

21. Gerenciamento de registros

O registro do procedimento de todas as etapas do processo devem ser mantidas no laboratório, conforme descrito em seus sistemas de gestão da qualidade. Esses registros devem estar prontamente disponíveis para auditoria ou revisão em todos os momentos.

22. Referências

- 22.1. 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)). Acessado em 3 de abril de 2023

23. Anexos/apêndices

Apêndice 1

Preparação do tampão de sensibilização (coating buffer) (0,1 M NaHCO₃, pH 9,6):

1. Dissolva 8,4g de NaHCO₃ em 900 ml de água destilada ou deionizada.
2. Verifique o pH da solução com o medidor de pH. O pH deve estar entre 9,5-9,7.
3. Adicione água para atingir um volume final de 1 litro.
4. Rotule a solução, incluindo preparação e data de validade (7 dias após a preparação). Armazene a 4°C. Conserve por não mais de uma semana.

10X PBS:

1. Pese:

- NaCl 80 g
- KCl 2,0 g
- KH₂PO₄ 2,4g
- Na₂HPO₄ 14,4 g

2. Dissolva todos os ingredientes em 800 ml de água destilada ou deionizada e ajuste o volume final para 1L.
3. Verifique o pH com o medidor de pH. O pH deve estar entre 7,0-7,4.
4. Rotule a solução com a preparação e a data de validade. Armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 2

Preparação do PBS Tween (PBST):

1. Meça e misture:

10X PBS	100 ml
Tween 20	0,5ml
Água destilada ou deionizada	900 ml

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 12 de 13

Nota: o Tween 20 é muito viscoso e pode ser difícil de pipetar com precisão. Para facilitar, torne-o mais fluido aquecendo-o por um curto período no micro-ondas, na incubadora a 56 °C ou em banho-maria.

2. Rotule a solução com a preparação e a data de validade. Mantenha em uma pisseta em temperatura ambiente.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-002	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 13 de 13	

Apêndice 3

Preparação do PBST-BSA

1. Dissolva 5g de BSA em 100 ml de PBST.
2. Rotule com a preparação e a data de validade.
3. Armazene a 4°C

Solução de parada (3M NaOH)

1. Dissolva 12g de NaOH em 80ml de água desionizada ou destilada.
2. Ajuste o volume final para 100ml.
3. Rotule a solução com a preparação e a data de validade.
4. Armazene em temperatura ambiente.

24. Histórico de revisões

Rev nº	3DCR nº	Alterações feitas no documento	Data
Novo		Novo documento	01/

25. Assinaturas de aprovação

Aprovado por: _____
 Autor Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Revisor SME Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Laboratório de Referência de Oncocercose da USF Data

 Imprimir nome e título

2. USF-003 Extração de DNA de simulídeos *Simulium* para detectar *Onchocerca volvulus*

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 1 de 13

1. Objetivo

Este protocolo descreve a extração de DNA de Simuliídeos do gênero *Simulium* para a detecção de estágios larvais infecciosos de *Onchocerca volvulus*, o agente causador da Oncocercose (cegueira dos rios). A extração de DNA será feita a partir de agrupamentos individuais (pools) de até 100 simuliídeos capturadas na natureza. A prevalência de simuliídeos portadoras de larvas infecciosas é uma métrica primária recomendada pela OMS para pesquisas de MDA e é a única métrica usada pela OMS para verificar a eliminação da transmissão.

2. Escopo

Este procedimento aplica-se aos laboratórios que pertencem à Rede de Diagnóstico Laboratorial de Oncocercose gerida pela USFCC que irá testar lotes de simuliídeos para infecções por *Onchocerca volvulus*.

Os simuliídeos devem ser coletados na natureza de acordo com métodos de coleta padrão e preservadas em solução de álcool etílico ou isopropanol na concentração mínima de 70%. Os Simuliídeos devem ser identificados de acordo com critérios morfométricos quando estiver no laboratório e processe apenas aquelas identificadas como *Simulium damnosum sensu lato*. Registre o número de *S. damnosum s.l.* em cada pool em uma planilha do Excel antes de iniciar o processamento.

NOTA 1:

este protocolo envolve a abertura das placas de PCR e a análise da amostra pós-PCR. Isso significa que se está trabalhando com amplicons pós-PCR, que apresentam um grande risco de contaminação reversa, o que cria problemas técnicos que podem levar meses para serem resolvidos. **É CRÍTICO** que todas as etapas anteriores à PCR sejam estritamente isoladas daquelas realizadas após a PCR. Isso significa que **NADA** deve passar da área pós-PCR/ELISA para a área pré-PCR/PCR. Para garantir que isso não aconteça as áreas pré-PCR/PCR e pós-PCR, devem ser separadas fisicamente, de preferência em salas separadas. **NÃO inicie este protocolo se estiver trabalhando na área pós-PCR/ELISA naquele dia.** Use luvas durante todo o procedimento.

NOTA 2:

o laboratório deve ter sala designada para cada atividade, com a) equipamentos de proteção individual dedicados, incluindo jalecos, luvas e óculos de proteção; b) instrumentos; c) suprimentos; e d) conjuntos de pipetas para o isolamento do DNA.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 2 de 13

Os laboratórios devem ter um fluxo de trabalho definido de forma inequívoca, e os colaboradores não devem se deslocar da área pós-PCR para a área pré-PCR/PCR durante o mesmo dia. Para fazer um PCR e um ELISA pós-PCR no mesmo dia, prepare o PCR primeiro e DEPOIS faça o PCR ELISA.

Todo o trabalho de laboratório deve usar ponteirass com barreira de aerossol para evitar contaminação.

NOTA 3:

também é melhor separar as etapas de isolamento de DNA e PCR por tempo. Por exemplo, prepare o DNA de todos os pools primeiro e, uma vez que o DNA esteja preparado, prossiga para as análises de PCR e pós-PCR.

Todos os reagentes e tampões devem ser preparados com água destilada ou deionizada de alta qualidade.

3. Documentos relacionados

Título	Número de controle do documento
Manual externo de garantia de qualidade	USF-001

4. Responsabilidade

Posição	Deveres
Equipe técnica do laboratório	• Estar em conformidade com as políticas e procedimentos do laboratório • Ler e entender o protocolo • Realizar os ensaios de acordo com o protocolo • Registrar os resultados de acordo com o protocolo

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simuliídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 3 de 13

Supervisor	- Desenvolver e implementar políticas, processos e procedimentos para garantir que todas as funções críticas do laboratório sejam realizadas sob condições controladas - Certificar-se de que toda a equipe técnica esteja treinada e bem instruída - Revisar e aprovar resultados
------------	--

5. Definições

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

PCR: Reação em cadeia da polimerase

USF: Universidade do Sul da Flórida

MDP: Programa de doação Mectizan

USFCC: Laboratório de Referência de Oncocercose da USF

6. Equipamentos/materiais para separação das cabeças e corpos das simuliídeos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Suporte para tubos Flipper - 96 poços	Qualquer	
Termobloco	Qualquer	
Freezer ultrabaixa temperatura -70 °C	Qualquer	
Congelador -20 °C	Qualquer	
Micropipetas ajustáveis de 1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL	Qualquer	
Micropipeta multicanal de 20-200 µL	Qualquer	
Microcentrífuga (capacidade de 12 ou 24 tubos) com capacidade de 14.000 xg	Qualquer	
Rotator de tubos (tube rocker)	Qualquer	
Vortex	Qualquer	
Termociclador	Qualquer	
Placa magnética de 96 poços	Qualquer ou Fisher	12331D
Medidor de pH	Qualquer	
Balança de carga superior com precisão de 10 mg	Qualquer	
Balança analítica com precisão de 0,1 mg	Qualquer	

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 4 de 13

7. Reagentes e suprimentos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Luvas de látex ou nitrilo	Qualquer	
Tubos de microcentrifuga de 1,5 mL ou 1,7 ml	Qualquer	
Homogeneizadores de plástico azul descartáveis	Fischer	
Ponteiras com barreira de aerossol (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Qualquer	
Placas de PCR de 96 poços	Qualquer	
Seladores de placas PCR	Qualquer	
Etanol 95%	Qualquer	
Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA dissódico, pH 8,0)	Preparado em laboratório ou Fisher	BP2473
10 mg/ml de proteinase K	Fischer	BP1700-100
1M DTT	Fischer	BP172
1M Tris HCl (pH 7,5)	Preparado em laboratório	
4M NaCl	Preparado em laboratório	
0,5 uM de OVS2-biotina. (5'B-AATCTCAAAAACGGGTACATA-3', em que B = biotina)	Fornecido pelo USFCC	
Dynabeads M-280 revestido com estreptavidina	Invitrogen	#112-05D
Tampão de ligação de esferas (100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl).	Preparado em laboratório	
Água ultrapura para PCR	Qualquer	
Tris Base	Qualquer	
EDTA dissódico di-hidratado	Qualquer	
DTT	Fischer	BP172
NaCl	Qualquer	

8. Suprimentos, outros materiais

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
------	------------------------	--------------------

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simúlídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 5 de 13

Água destilada ou deionizada. Reagente ou água de grau molecular também é aceitável.	Qualquer	
--	----------	--

9. Precauções de segurança

- 9.1. Os procedimentos devem ser realizados em conformidade com todas as políticas e procedimentos de segurança institucionais, em conformidade com a 6ª edição do documento orientativo - *Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC* ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)).
- 9.2. **Equipamento de proteção pessoal:** proteção para os olhos, luvas e jaleco devem ser usados o tempo todo
- 9.3. **Requisitos de contenção:** aplicam-se precauções universais
- 9.4. **Resposta a derramamento:** n/a

10. Coleta, armazenamento, preservação e transporte de amostras

Os simuliídeos devem ser coletados na natureza de acordo com métodos de coleta padrão e preservados em solução de álcool etílico ou isopropanol na concentração mínima de pelo menos 70% de etanol ou isopropanol. Os simuliídeos devem ser identificados de acordo com critérios morfométricos quando estiver no laboratório e processe apenas aquelas identificadas como *Simulium damnosum* sensu lato. Registre o número de *S. damnosum damnosum* s.l. em cada pool em uma planilha do Excel antes de iniciar o processamento.

11. **Obtenção de espécimes:** o laboratório de testes insere as informações do lote em um documento mestre do Excel "O-150 PCR ELISA". Cada lote de amostras receberá um identificador exclusivo que permite o rastreamento de amostras e lotes.

12. Controle de qualidade

Controles positivos e negativos fornecidos pelo USFCC.

13. Tabela de fluxo de trabalho ou processo (opcional)

- 13.1. Indique os números do prédio e da sala onde as amostras de simuliídeos serão processadas.
- 13.2. Indique os números do prédio e da sala onde os congeladores estarão localizados.

14. Procedimento para processamento de simuliídeos, na sala de processamento de simuliídeos.

- 14.1. Planeje as extrações de DNA em lotes de 12 pools por vez, considerando que cada lote incluirá duas extrações simuladas (SHAM). O número de pools pode ser ajustado com

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simuliídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 6 de 13

base na **capacidade da sua centrífuga**. As extrações duplas (SHAM) são tubos vazios que passam pelo processo exatamente como se contivessem simuliídeos. **Elas são necessárias para garantir que o processo de extração de DNA permaneça livre de contaminação.**

- 14.2. Lave as amostras de Simuliídeos em etanol 95%. Coloque as amostras em uma placa de Petri. Deixe o etanol evaporar até que os Simuliídeos pareçam estar secos. Não permita que simuliídeos sequem completamente, ou a purificação da cabeça não funcionará.
- 14.3. Coloque os simuliídeos em um tubo cônico de centrífuga de polipropileno limpo e seco de 15 ml. Rotule o tubo.
- 14.4. Coloque o tubo no freezer a -70 °C por pelo menos 2 horas ou na fase de vapor de nitrogênio líquido (se disponível) por pelo menos 30 minutos.
- 14.5. Quebre as cabeças batendo vigorosamente o tubo no mousepad de espuma colocado sobre a bancada. Isso separará as cabeças dos corpos.
- 14.6. Ressuspenda as cabeças e corpos separados em etanol 95% e os remova do tubo com uma pipeta de transferência larga de plástico. A quantidade de etanol não é importante, mas tente obter todo o material de Simuliídeos.
- 14.7. Passe a mistura de etanol/simuliídeo por uma peneira de malha 25 conectada a um recipiente. Os corpos se acumularão no recipiente e as cabeças passarão. Lave os simuliídeos coletados na peneira para garantir que todas as cabeças passem.
- 14.8. Recolha as cabeças do recipiente e os corpos da peneira usando uma pipeta de transferência com abertura larga e os coloque em placas de Petri separadas de 35 mm. Examine-os com o estereomicroscópio para confirmar se a separação foi bem-sucedida.
- 14.9. Colete as cabeças separadas da placa de Petri usando uma pipeta de transferência de abertura larga e as transfira para tubos com tampa de encaixe de 1,5 ml etiquetados da seguinte forma: HNNN, em que H = Cabeça e NNN = é o número da amostra do pool. Rotule outro tubo, B001 (B = Corpo, 001 = mesmo número de amostra).
- 14.10. Depois que as cabeças forem coletadas, proceda de maneira semelhante para coletar os corpos separados da placa de Petri: use uma pipeta de transferência de abertura larga e os transfira para tubos de tampa de pressão de 1,5 ml rotulados como BNNN, em que B = Corpo e NNN = é o número de amostra correspondente ao pool. O número de amostra do pool deve ser o mesmo nos tubos H e B.
- 14.11. As amostras podem ser mantidas a 4 °C indefinidamente ou pode ser dado prosseguimento à seção de isolamento de DNA.

15. Procedimento para extração de DNA de simuliídeos

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 7 de 13

- 15.1. Planeje as extrações de DNA em lotes de 12 pools por vez, considerando que cada lote incluirá duas extrações simuladas (SHAM). O número de pools pode ser ajustado com base na **capacidade da sua centrífuga**. As extrações duplas (SHAM) são tubos vazios que passam pelo processo exatamente como se contivessem simulídeos. **Elas são necessárias para garantir que o processo de extração de DNA permaneça livre de contaminação.**
- 15.2. lave cada um dos tubos de amostra do pool selecionados três vezes com etanol 95%. Remova o máximo possível de etanol usando uma pipeta de ponta estreita ou ponta de 200 µL.
- 15.3. Deixe o etanol evaporar por cerca de 10 minutos em temperatura ambiente.
- 15.4. Adicione 200 µL de tampão TE às cabeças ou corpos, homogeneize as cabeças ou corpos com um homogeneizador de plástico azul descartável. Continue até que as amostras estejam completamente maceradas.
- 15.5. Adicione 40 µL de proteinase K 10 mg/ml.
- 15.6. Incube por 2 horas a 56 °C no termobloco.
- 15.7. Adicione 20 µL de 1M DTT e adicione 240 µL TE para que o volume total chegue a aproximadamente 500 µL.
- 15.8. Perfure a parte superior do tubo com uma agulha para fornecer ventilação e incube a 95 °C por 30 minutos. Observe os tubos de perto, pois alguns ainda podem abrir durante a incubação. Se isso acontecer, feche-os imediatamente para evitar contaminação cruzada.
- 15.9. Congele e descongele o extrato duas vezes.
- 15.10. Congele os tubos a -70 °C por pelo menos 15 min e deixe descongelando na bancada (por aproximadamente mais 15 minutos ou até que descongelem completamente). NÃO descongele rapidamente aquecendo na mão ou em banho-maria. O descongelamento lento é necessário para permitir que os cristais de gelo litem as células e liberem o DNA.
- 15.11. Centrifugue as amostras por 5 minutos na velocidade máxima (14.000 xg). Transfira o sobrenadante para novos tubos de 1,5 ml.
- 15.12. Adicione 50 µL de 1M Tris HCl (pH 7,5) e 12,5 µL de 4M NaCl a cada amostra.
- 15.13. Adicione 5 µL de 0,5 uM de OVS2-biotina a cada amostra.
- 15.14. Incube os tubos a 95°C por três minutos no termobloco e deixe esfriar lentamente em temperatura ambiente na bancada. Esse resfriamento lento permite que os oligonucleotídeos encontrem e hibridizem com o DNA do parasita na amostra.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simuliídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 8 de 13

- 15.15. Preparação do Dynabeads M-280 Streptavidin. Enquanto as amostras estão esfriando, prepare as esferas magnéticas, pois elas são enviadas em uma solução contendo conservante.
- 15.16. Calcule o volume de esferas necessárias para o número total de amostras com as quais se está trabalhando. São necessários 10 µL por amostra da solução estoque a 10 mg/ml. Por exemplo, para 12 amostras, são necessários 120 µL de esferas magnéticas.
- 15.17. Ressuspenda as esferas invertendo o frasco original por >30 seg. ou incline e gire o frasco por 5 minutos.
- 15.18. Transfira o volume desejado em lotes de 50 µL para os primeiros poços na linha A da placa de PCR (A1, A2, A3, A4 etc.). Coloque a placa no ímã e deixe as esferas se agruparem por 2 minutos.
- 15.19. Lave as esferas com tampão de ligação de 200 µL. Deixe as esferas se agregarem por 5 minutos no ímã, remova e descarte cuidadosamente o sobrenadante. Repita a lavagem quatro vezes, totalizando cinco lavagens.
- 15.20. Remova a placa do ímã e ressuspenda as esferas lavadas com o tampão de ligação no mesmo volume que o volume inicial de esferas retiradas do frasco.
- 15.21. Adicione 10 µL da solução de esferas lavadas a cada amostra. Incube as amostras no rotator de tubos durante a noite à temperatura ambiente. (Observação: o procedimento pode ser interrompido aqui no final do primeiro dia).
- 15.22. Pipete 100 µL das amostras nas fileiras B-H da mesma placa de PCR utilizada acima para preparar as esferas/beads magnéticas. Coloque a placa no magneto. Deixe as esferas se acumularem no ímã por cinco minutos.
- 15.23. Remova cuidadosamente o sobrenadante com uma micropipeta, usando novas ponteiros para cada amostra. Pipete sequencialmente outros 100 µL da amostra no poço, incube por cinco minutos para que as esferas se agreguem no lado voltado para o magneto antes de remover a solução e adicionar a próxima alíquota. Tenha cuidado para encostar nas esferas já agregadas junto ao magneto durante este processo.
- 15.24. Lave as esferas 6 vezes com 150 µL de tampão de ligação por lavagem, usando uma pipeta multicanal. Para fazer isso, remova a placa do magneto, pipete lavagem solução de lavagem em cada poço com a pipeta multicanal e homogeneíze por pipetagem. Certifique-se de usar pipetas com filtro.
- 15.25. Assim que as esferas forem ressuspensas, coloque a placa de volta no magneto e deixe as esferas se agregarem por cinco minutos como antes. Remova cuidadosamente o

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 9 de 13

sobrenadante como descrito acima. Repita o processo cinco vezes mais, para um total de seis lavagens.

- 15.26. Após a última lavagem, remova cuidadosamente o máximo possível de sobrenadante das esferas coletadas na lateral dos poços. Ressuspenda as esferas em 20 µL de água para PCR. Transfira as amostras (solução e esferas) para uma placa de PCR. Sele a placa com um selador de placas.
- 15.27. Coloque a placa no termociclador e execute o seguinte programa:
 - 80 °C por 2 minutos
 - Manter a 4 °C.
 Isso liberará o DNA capturado das esferas magnéticas.
- 15.28. Coloque a placa em cima do magneto por 2 minutos. Esta etapa é de coleta das esferas magnéticas.
- 15.29. Remova cuidadosamente o sobrenadante usando uma pipeta multicanal de 200 µL e transfira o DNA extraído para uma nova placa. Coloque um selador na placa. Rotule a placa incluindo informações da amostra, iniciais e informações sobre executores do ensaio. Lembrete: esta placa contém o DNA purificado.
- 15.30. Armazene a placa a -20 °C até ser usada para PCR.

16. Controle de qualidade interno

Os dois tubos SHAM serão testados por PCR.

17. Análises/cálculos

Não aplicável

18. Valores de referência/valores de alerta

Não aplicável.

19. Interpretação dos resultados

Se algum dos tubos SHAM tiver resultados positivos de PCR, o PCR será repetido apenas com os tubos SHAM. Se os resultados da PCR continuarem a ser positivos, isso poderá invalidar o processo de extração de DNA devido a potencial contaminação.

20. Revisão e aprovação de resultados

Esta é a primeira etapa de um procedimento, e os resultados serão relatados após a amplificação por PCR.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 10 de 13	

21. Relatório de resultados; Diretrizes para notificação

Quaisquer achados da extração de DNA serão relatados com os resultados da amplificação por PCR.

22. Retenção e armazenamento de amostras

O DNA extraído e o DNA restante deverão ser devidamente rotulados e armazenados no congelador designado a -70 °C por um período mínimo de três anos.

23. Gerenciamento de registros

O registro de todas as etapas do processamento deve ser mantido no laboratório, conforme descrito em seus sistemas de gestão da qualidade. Esses registros devem estar prontamente disponíveis para auditoria ou revisão a qualquer momento.

24. Referências

- 24.1. 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)). Acessado em 3 de abril de 2023

25. Anexos/apêndices

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 11 de 13

Apêndice 1

Preparação de 1M Tris HCl, pH 7,5:

1. Dissolva 121,1 g de Tris Base em 800 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o pH para 7,5 usando o medidor de pH e HCl.
3. Ajuste o volume final para 1 litro com água destilada ou deionizada.
4. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 2

Preparação de 1M Tris HCl, pH 8,0:

1. Dissolva 121,1 g de Tris Base em 800 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o pH para 8,0 usando o medidor de pH e HCl.
3. Ajuste o volume final para 1 litro com água destilada ou deionizada.
4. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 3

Preparação de 500 mM EDTA:

1. Dissolva 186,1 g de EDTA dissódico di-hidratado em 350 ml de água destilada ou deionizada.
2. Adicione HCl ou NaOH para ajustar o pH final para 8,0 usando o medidor de pH.
 - 2.1. Observe que o EDTA levará muito tempo para dissolver e, à medida que dissolve, o pH se afastará de 8,0.
3. Continue adicionando ácido ou NaOH até que dissolva completamente e o pH seja 8,0.
4. Ajuste o volume final para 500 ml com água destilada ou deionizada.
5. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 4

4M NaCl:

1. Dissolva 116,9 g de NaCl em 300 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o volume final para 500 ml usando água destilada ou deionizada.
3. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 5

1M DTT:

1. Dissolva 154,3 mg de DTT em 900 µL de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o volume final para 1 ml com água destilada ou deionizada.
3. Rotule e armazene a -20 °C.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 12 de 13

Apêndice 6

Tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA dissódico, pH 8,0)

1. Meça e misture:

1M Tris-HCl, pH 8,0	5 ml
500 mM EDTA	1 ml
água destilada ou desionizada	494 ml

2. Coloque uma barra de agitação no recipiente e misture em uma placa de agitação por pelo menos um minuto

3. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 7

Tampão de ligação de esferas (100 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl):

1. Meça e misture:

1M Tris-HCl, pH 7,5	50 ml
4M NaCl	12,5 ml
água destilada ou desionizada	437,5 ml

2. Coloque uma barra de agitação no recipiente e misture em uma placa de agitação por pelo menos um minuto

3. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 8

10 mg/ml de proteinase K:

1. Meça e misture

proteinase K (pesar)	50 mg
Tampão TE	5 ml

2. Coloque uma barra de agitação no recipiente para dissolver e misture em uma placa de agitação por pelo menos três minutos

3. Rotule 10 tubos de microcentrífuga de 1,5 para fazer alíquotas

4. Usando uma pipeta de 1000 µL e ponteiras, faça alíquotas em 10 alíquotas de 500 µL.

5. Armazene a -70 °C.

6. **Instruções especiais**

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Extração de DNA de simuliídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-003	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 13 de 13	

- 6.1. As alíquotas devem permanecer congeladas até o uso. Depois de descongeladas, elas não podem ser congeladas novamente.
- 6.2. Cada alíquota (no tubo de microcentrífuga de 1,5 ml) será suficiente para processar 12 amostras.
- 6.3. Uma vez descongelado, o restante da alíquota deverá ser descartado.
- 6.4. Não volte a congelar em momento algum.

26. Histórico de revisões

Rev #	3DCR #	Alterações feitas no documento	Data
Nova		Novo documento	

27. Assinaturas de aprovação

Aprovado por: _____
 Autor Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Revisor SME Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Laboratório de Referência de Oncocercose da USF Data

3. USF-004 Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de
Onchocerca volvulus

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 1 de 12

1. Objetivo

Este protocolo descreve a detecção de larvas em estágio infectivo de *Onchocerca volvulus*, o agente causador da oncocercose (cegueira dos rios), em DNA extraído de pools de até 100 simuliídeos capturadas na natureza (SOP USF-003). A prevalência de simuliídeos portadores de larvas infecciosas é uma métrica primária recomendada pela OMS para pesquisas de MDA e é a única métrica usada pela OMS para verificar a eliminação da transmissão.

2. Âmbito

Este procedimento aplica-se aos laboratórios que pertencem à Rede de Diagnóstico Laboratorial de Oncocercose gerida pelo Laboratório de Referência de Oncocercose da USF. Esses laboratórios realizarão PCR no DNA extraído de cabeças ou corpos de simuliídeos *Simulium* como parte das avaliações do programa para a eliminação de *Onchocerca volvulus*.

3. Documentos relacionados

Título	Número de controle do documento
Manual externo de garantia de qualidade	USF-001
Extração de DNA de simuliídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>	USF-003
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150	USF-005

4. Responsabilidade

Posição	Deveres
Equipe técnica do laboratório	- Em conformidade com as políticas e procedimentos do laboratório - Ler e entender o protocolo - Realizar testes de acordo com o protocolo - Registrar os resultados de acordo com o protocolo

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 2 de 12

Supervisor	- Desenvolver e implementar políticas, processos e procedimentos para garantir que todas as funções críticas do laboratório sejam realizadas sob condições controladas - Certificar-se de que toda a equipe técnica esteja treinada e tenha experiência - Revisar e aprovar resultados
------------	--

5. Definições

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

PCR: Reação em cadeia da polimerase

USF: Universidade do Sul da Flórida

MDP: Programa de doação Mectizan

USFCC: Laboratório de Referência de Oncocercose da USF

6. Equipamentos/materiais para separação das cabeças e corpos das simúldeos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Câmara Asséptica /Cabine Limpa para PCR	Qualquer	
Suporte para tubos Flipper - 96 poços	Qualquer	
Ultrafreezer -70 °C	Qualquer	
Congelador -20 °C	Qualquer	
Micropipetas ajustáveis de 1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL dedicadas à preparação do master mix	Qualquer	
Micropipeta ajustável de 1-20 µL dedicada à adição de controle positivo (área pós-PCR)	Qualquer	
Micropipeta multicanal de 20-200 µL	Qualquer	
Microcentrífuga (capacidade de 12 ou 24 tubos) com capacidade de 14.000 xg	Qualquer	
Agitador Vortex	Qualquer	
Medidor de pH	Qualquer	
Balança de carga superior com precisão de 10 mg	Qualquer	
Termociclador, convencional	BioRad	

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 3 de 12

7. Reagentes e suprimentos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Luvas de látex ou nitrilo	Qualquer	
Tubos de microcentrifuga de 1,5 mL ou 1,7 ml	Qualquer	
Ponteiras de barreira de aerossol (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Qualquer	
Placas de PCR de 96 poços	Qualquer	
Filme selador de placas PCR	Qualquer	
Tampão de PCR 10X	Preparado em laboratório	
Mistura dNTP de 2 mM	Preparado em laboratório (estoques da Invitrogen)	
Soluções de estoque dNTP	Thermo Fisher	
Iniciadores O-150 20uM	Thermo Fisher	
Taq polimerase	Qualquer	
Controle positivo O-150	USFCC	
Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	Qualquer	
Tris base	Qualquer	
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	Qualquer	

8. Suprimentos, outros materiais

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
PCR ou água de grau molecular.	Qualquer	

9. Precauções de segurança

- 9.1. Os procedimentos devem ser realizados em conformidade com todas as políticas e procedimentos de segurança institucionais, de acordo com a 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC.
- 9.2. **Equipamento de proteção pessoal:** proteção para os olhos, luvas e jaleco devem ser usados o tempo todo
- 9.3. **Requisitos de contenção:** aplicam-se precauções universais
- 9.4. **Resposta a derramamento:** n/a

10. Coleta, armazenamento, preservação e transporte de amostras

DNA extraído e armazenado de acordo com o SOP USF-003

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 4 de 12

11. Obtenção de espécimes

Não aplicável. No entanto, o laboratório deve ter um documento mestre em Excel, nomeado "O-150 PCR ELISA" que permita o rastreamento de amostras e lotes.

12. Controle de qualidade

Controles positivos fornecidos pelo USFCC.

13. Tabela de fluxo de trabalho ou processo (opcional)

- 13.1. Indique os números do prédio e da sala onde master mix será preparado, onde o PCR será preparado e executado e onde o ELISA será lido.
- 13.2. Indique os números do prédio e da sala onde os congeladores estarão localizados.

14. Preparação do Mastermix (área de pré-PCR/PCR)

- 14.1. A equipe técnica NÃO deverá iniciar este protocolo caso tenha trabalhado na área pós-PCR/ELISA no mesmo dia destinado para execução deste ensaio.
- 14.2. Use jalecos, luvas e óculos de proteção pré-PCR/PCR durante todo o procedimento.
- 14.3. O master mix deve ser preparado na Câmara Asséptica /Cabine Limpa de PCR usando pipetas e ponteiras com barreira de aerossol exclusivamente dedicadas ao preparo do Master Mix.
- 14.4. Retire todos os reagentes de PCR (tampão 10X, primers, dNTPs, Taq polimerase) do congelador e mantenha em um balde de gelo na área de pré-PCR/PCR e deixe-os descongelar. Mantenha a Taq polimerase no gelo.
- 14.5. Centrifugue todos os reagentes por 30 segundos.
- 14.6. Prepare a quantidade de master mix de acordo com o número de amostras a serem processadas. Veja a tabela abaixo para exemplos de 1 reação e 100 reações (uma placa). Considere no cálculo aproximadamente 10% a mais de reações, para compensar as perdas durante a pipetagem.
- 14.7. Misture o conteúdo do tubo de master mix por vórtice suave.
- 14.8. Remova o master mix da Câmara Asséptica/Cabine Limpa de PCR. Aliquote 45 µL do master mix em cada poço de uma placa de PCR de 96 poços.
- 14.9. Mantenha a placa no gelo e devolva os reagentes ao congelador.

Reagente	Volume necessário para 1 reação	Volume necessário para 100 reações
Água de PCR	32 µL	3,2MI
Tampão de 10X	5 µL	500 µL
dNTPs de 2 mM	5 µL	500 µL

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 5 de 12

Primer 20uM 1632	1,25 µL	125 µL
Primer de biotina 20uM 1633	1,25 µL	125 µL
Taq polimerase	0,5 µL	50 µL
Volume total	45 µL	4,5MI

15. Procedimento para adicionar DNA extraído para amplificação por PCR (área pré-PCR/PCR)

- 15.1. Os controles negativos devem ser adicionados antes de qualquer amostra ou controle positivo de DNA. Cada reação de controle negativo deve conter 5 µL de água de PCR no lugar do DNA.
- 15.2. Adicione 5 µL das amostras de DNA purificadas selecionadas usando pipeta multicanal. Use o seguinte modelo:

Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	pos + DNA
Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	SHA	SHAM
Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	SHA	SHAM
Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	SHA	SHAM
Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	SHA	SHAM
Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	SHA	SHAM
Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	Amostr	SHA	SHAM

- 15.3. Cada placa de PCR completa terá até duas reações de controle positivo (nos poços A11 e A12) e 10 reações de controle negativo (nas fileiras A1-A10). De maneira geral, cada placa de ELISA acomoda 84 reações de PCR, totalizando em um única placa DNA de 70 pools de cabeça, 14 extrações simuladas, 10 controles negativos e dois controles positivos.

16. Adição de controles positivos

- 16.1. Cubra a placa e mova-a para a **área pós-PCR**.
- 16.2. Na área pós-PCR, separe uma pequena área da bancada longe de todas as outras atividades como área de adição de controle positivo.
- 16.3. Coloque a placa nessa área e adicione o controle positivo (consulte o **Apêndice 1** para preparação de controle positivo) usando a pipeta dedicada a esse fim.
- 16.4. No poço A11, adicione 2,5 µL do DNA de controle positivo da PCR mais 2,5 µL de DNA de uma preparação de um pool que tenha testado negativo anteriormente. Como

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 6 de 12

alternativa, 2,5 µL de DNA que foi preparado a partir de um pool de 100 simulídeos sabidamente não infectadas (coletadas de uma região não endêmica confirmada). T

- 16.5. No poço A12, adicione 2,5 µL do DNA de controle positivo (de 16,3 acima).
- 16.6. Sele com um selador de placas.
- 16.7. Troque suas luvas e **retorne à área de pré-PCR.**
- 16.8. Coloque a placa no termociclador e prossiga para a amplificação por PCR. Os parâmetros de ciclagem para as amplificações de PCR são os seguintes:
 - Etapa 1: 94 °C por 1 min
 - Etapa 2: 37 °C por 2 min
 - Etapa 3: 72 °C por 30 segundos
 - Etapa 4: repita as etapas 1 a 3 por um total de 5 ciclos
 - Etapa 5: 94 °C por 30 segundos
 - Etapa 6: 37 °C por 30 segundos
 - Etapa 7: 72 °C por 30 segundos
 - Etapa 8: repita as etapas 5 a 7 por um total de 35 ciclos
 - Etapa 9: mantenha a 4 °C
- 17. Análises/cálculos**
Não aplicável
- 18. Valores de referência/valores de alerta**
Não aplicável.
- 19. Interpretação dos resultados**
 Se algum dos tubos simulados (SHAM) apresentar resultados positivos de PCR, o PCR será repetido apenas com os tubos simulados (SHAM). Se os resultados do PCR continuarem a ser positivos, isso poderá invalidar o processo de extração de DNA devido a potencial contaminação.
 O controle positivo no poço A12 dirá se a reação de PCR funcionou da maneira mais eficiente possível. O controle positivo no poço A11 (poço com 2,5 µL de DNA de simulídeos negativos conhecidas) demonstrará que as preparações de DNA de simulídeo não inibem a PCR.
- 20. Revisão e aprovação de resultados**

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 7 de 12

Esta é a primeira etapa de um procedimento, e os resultados serão relatados após a amplificação por PCR.

21. Relatório de resultados; Diretrizes para notificação

Quaisquer achados da extração de DNA serão relatados com os resultados da amplificação por PCR.

22. Retenção e armazenamento de amostras

O DNA extraído e o DNA restante serão devidamente rotulados e armazenados no ultrafreezer designado a -70 °C por um período mínimo de três anos.

23. Gerenciamento de registros

O registro de procedimento de todas as etapas do processo deve ser mantidas no laboratório, conforme descrito em seus sistemas de gestão da qualidade. Esses registros devem estar prontamente disponíveis para auditoria ou revisão em todos os momentos.

24. Referências

- 24.1. 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)). Acessado em 3 de abril de 2023

25. Anexos/apêndices

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 8 de 12

Apêndice 1

Preparação do controle positivo O-150.

Após o recebimento da USF, os controles positivos do O-150 precisam ser calibrados por meio da reatividade de PCR de diluições em série.

1. Trabalhe e prepare as diluições na área pós-PCR/ELISA utilizando a pipeta dedicada à adição de controle positivo.
2. Estabeleça seis diluições seriais de 10 vezes do material de controle positivo a utilizar. Para fazer isso, comece a diluir 2,5 µL do controle positivo não diluído da USF em 22,5 µL de tampão TE 8,0. Esta é a diluição de 1/10. Pegue 2,5 µL da diluição de 1/10 e adicione a 22,5 µL de tampão TE 8,0. Esta é a diluição de 1/100. Continue fazendo diluições da mesma maneira até obter um total de 6 diluições de 10 vezes. As diluições podem ser preparadas em placas de PCR ou em tubos de amplificação de PCR.
3. Prepare o master mix para 10 reações seguindo as instruções do item 14 acima.
4. Coloque 47,5 µL de mastermix em nove poços (se estiver executando uma placa) ou tubos de PCR.
5. Adicione 1,5 µL de água de PCR a cada poço/tubo
6. 1 µL de cada diluição em série do DNA de controle positivo. Veja o modelo de placa proposto abaixo

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. Execute o PCR usando as condições de amplificação descritas no item 15 acima.
8. Identifique a diluição mais alta que apresente um resultado positivo de PCR. Use a diluição que é 100 vezes mais concentrada do que esta diluição (por exemplo, se a diluição 1/100.000 for detectada de forma confiável, use a diluição 1/1000) e prepare 100 µL dessa diluição usando 10 µL da diluição de 100 vezes em 90 µL de tampão TE 8,0.
9. Use 2,5 µL dessa diluição como controle positivo em todos os experimentos subsequentes. Armazene todas as diluições a -20 °C.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 9 de 12

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 10 de 12

Apêndice 2

Preparação de 1M Tris HCl, pH 9,0:

1. Dissolva 121,1 g de tris base em 800 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o pH para 9,0 usando o medidor de pH e HCl.
3. Ajuste o volume final para 1 litro, com água destilada ou deionizada.
4. Rotule, autoclave e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 3

Preparação de sulfato de amônio 1M ((NH₄)₂SO₄):

1. Dissolva 13,2 g de sulfato de amônio em 80 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o volume final para 100 ml com água destilada ou deionizada.
3. Rotule, autoclave e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 4

Preparação de cloreto de magnésio 1M (MgCl₂):

1. Dissolva 9,5 g de cloreto de magnésio em 80 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o volume final para 100 ml com água destilada ou deionizada.
3. Rotule, autoclave e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 5

Preparação do tampão de PCR 10X:

1. Prepare 50 ml a partir de soluções autoclavadas misturando:

Reagente/concentração	Concentração final	Volume a ser adicionado
1M Tris-HCl (pH 9,0)	600 mM	30 ml
1M (NH ₄) ₂ SO ₄	150 mM	7,5 ml
1M MgCl ₂	20 mM	1,0 ml
Água de PCR	---	11,5 ml

2. Aliquote em tubos de 1,5 ml.
3. Rotule e armazene a -20 °C.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023	Página 11 de 12

Apêndice 6

Preparação de dNTP, 2 mM cada

1. Prepare 5 ml com os seguintes reagentes:

Reagente/concentração	Concentração final	Valor adicionado
100 mM dATP	2 mM	100 µL
100 mM dATP	2 mM	100 µL
100 mM dATP	2 mM	100 µL
100 mM dATP	2 mM	100 µL
Água de PCR	---	4,6 ml

2. Faça alíquotas de 1 ml em tubos de 1,5 ml.
3. Rotule e armazene em -20 °C.

Apêndice 7

Preparação dos primers:

1. As sequências de primers para este ensaio são:
1632: 5' GATTYTTCCGRCGAANARCGC 3'
1633 biotina: 5' biotina-GCNRTRTAAATNTGNAAATTC 3'
Em que, N = A, G, C OU T, Y = C OU T, R = A OU G
2. A folha de especificações do primer indicará o número total de nmol presentes no frasco recebido. Dissolva os primers em 10 vezes o número de µL de água de PCR que há nmol no tubo. Por exemplo, se na folha de especificações houver 38 nmol no tubo, dissolva o primer em 380 µL de água de PCR. Isso produz uma solução de estoque de 100 uM.
3. Aliquite as soluções de estoque em alíquotas de 100 µL em tubos de criopreservação com tampa de rosca e armazene a -80 °C. Adicione 400 µL de água de PCR para uma solução de trabalho de 20 uM.
4. Rotule e armazene as soluções de trabalho a -20 °C.

Apêndice 8

10 mg/ml de proteinase K:

1. Meça e misture
proteinase K (pesar) 50 mg
Tampão TE 5 ml
2. Coloque uma barra de agitação no recipiente para dissolver e misture em uma placa de agitação por pelo menos três minutos.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>				
Doc. Nº. USF-004	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 15/05/2023		Página 12 de 12

3. Rotule 10 tubos de microcentrífuga de 1,5mL e prepare alíquotas.

26. Histórico de revisões

Rev #	3DCR #	Alterações feitas no documento	Data
Nova		Novo documento	01/

27. Assinaturas de aprovação

Aprovado por: _____
 Autor Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Revisor SME Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Laboratório de Referência de Data
 Oncocercose da USF

4. USF-005 Detecção de produtos de PCR por ELISA O-150

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 1 de 15	

1. Objetivo

Este protocolo descreve a detecção baseada em ELISA de DNA de larvas de *Onchocerca volvulus* em estágio infeccioso, após amplificação por PCR O-150 de pools de até 100 simulídeos capturadas na natureza (SOP USF-004).

2. Âmbito

Este procedimento aplica-se aos laboratórios que pertencem à Rede de Diagnóstico Laboratorial de Oncocercose gerida pelo Laboratório de Referência de Oncocercose da USF. Esses laboratórios realizarão PCR no DNA extraído de cabeças ou corpos de simulídeos *Simulium* como parte das avaliações do programa para a eliminação de *Onchocerca volvulus*.

3. Documentos relacionados

Título	Número de controle do documento
Manual externo de garantia de qualidade	USF-001
Extração de DNA de simulídeos <i>Simulium</i> para detectar <i>Onchocerca volvulus</i>	USF-003
Endpoint O-150 PCR Amplificação de DNA de <i>Onchocerca volvulus</i>	USF-004

4. Responsabilidade

Posição	Deveres
Equipe técnica do laboratório	- Em conformidade com as políticas e procedimentos do laboratório - Ler e entender o protocolo - Realizar testes de acordo com o protocolo - Registrar os resultados de acordo com o protocolo
Supervisor	- Desenvolver e implementar políticas, processos e procedimentos para garantir que todas as funções críticas do laboratório sejam realizadas sob condições controladas - Certificar-se de que toda a equipe técnica esteja treinado e tenha experiência - Revisar e aprovar resultados

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 2 de 15	

5. Definições

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

PCR: Reação em cadeia da polimerase

USF: Universidade do Sul da Flórida

MDP: Programa de doação Mectizan

USFCC: Laboratório de Referência de Oncocercose da USF

6. Equipamentos/materiais para separação das cabeças e corpos das simúlideos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Incubadora configurada a 37 °C	Qualquer	
Incubadora configurada a 42 °C	Qualquer	
Incubadora configurada a 56 °C	Qualquer	
Refrigerador a 4 °C	Qualquer	
Congelador a -20 °C	Qualquer	
Garrafas de esguicho de 500 ml	Qualquer	
Micropipetas ajustáveis de 1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL	Qualquer	
Micropipeta ajustável de 1-20 µL dedicada à adição de controle positivo (área pós-PCR)	Qualquer	
Micropipeta multicanal de 20-200 µL	Qualquer	
Leitor de placas ELISA capaz de ler a 650 nm	Qualquer	
Agitador Vortex	Qualquer	
Medidor de pH	Qualquer	
Balança de carga superior com precisão de 10 mg	Qualquer	

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 3 de 15	

7. Reagentes e suprimentos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Luas de látex ou nitrilo	Qualquer	
Ponteiras de barreira de aerossol (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Qualquer	
Filme selador de placas		
Estreptavidina 1 mg/ml	Thermo Fisher	434301
Placas de fundo redondo Immunolon 2 HB	Fischer	
Toalhas de papel	Qualquer	
Reservatórios de reagentes de 50 ml	Qualquer	
Tampão de revestimento	Preparado em laboratório	
Solução TBST	Preparado em laboratório	
Tampão de hibridização	Preparado em laboratório	
Hidróxido de sódio (NaOH)	Qualquer (local)	
Sonda OVS2-FI	USFCC	
Fragmentos Fab conjugados com antilfluoresceína-AP	Thermo Fisher	11426338910
Sistema de deteção Blue Phos	KPL	50-88-22
Solução de parada AP	KPL	50-89-00
Tampão de lavagem SSPE/SDS	Preparado em laboratório	
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Qualquer	
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	Qualquer	
Tris base	Qualquer	
Tween 20	Qualquer	
Cloreto de Sódio (NaCl)	Qualquer	
Albumina de soro bovino, fração V (BSA)	Qualquer	
Fosfato de sódio dibásico (NaH ₂ PO ₄)	Qualquer	
EDTA dissódico di-hidratado	Qualquer	
Polivinilpirrolidona	Qualquer	
Ficoll 400	Qualquer	
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Qualquer	

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023		Página 4 de 15

N-lauril sarcosina	Qualquer	
--------------------	----------	--

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 5 de 15	

8. Suprimentos, outros materiais

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Água destilada ou reagente.	Qualquer	

9. Precauções de segurança

- 9.1. Os procedimentos devem ser realizados em conformidade com todas as políticas e procedimentos de segurança institucionais, de acordo com a 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC
- 9.2. **Equipamento de proteção pessoal:** proteção para os olhos, luvas e jaleco devem ser usados o tempo todo.
- 9.3. **Requisitos de contenção:** aplicam-se precauções universais
- 9.4. **Resposta a derramamento:** n/a

10. Coleta, armazenamento, preservação e transporte de amostras

Este POP se destina a detectar DNA em placas que foram submetidas à amplificação por PCR, conforme descrito no POP USF-004. As placas devem ser lidas no mesmo dia ou no dia seguinte após a amplificação por PCR. As placas devem permanecer cobertas e armazenadas a 4 °C até o início do teste ELISA.

11. Obtenção de espécimes

Não aplicável, no entanto, o laboratório deve ter um documento mestre em Excel "O-150 PCR ELISA" que permita o rastreamento de amostras e lotes.

12. Controle de qualidade

Os controles positivos foram incluídos no procedimento de amplificação por PCR (POP USF-004) e previamente fornecidos pelo USFCC.

13. Tabela de fluxo de trabalho ou processo (opcional)

- 13.1. Indique os números do prédio e da sala onde o master mix será preparado, onde o PCR será preparado e executado e onde o ELISA será lido.
- 13.2. Indique os números do prédio e da sala onde os congeladores estarão localizados.

14. Preparação para ELISA (área pós-PCR)

- 14.1. Quando a reação de PCR estiver completa, remova a placa do termociclador e vá para a área pós-PCR sem retirar o selador de placa. NÃO retire o selador da placa até que esteja na área pós-PCR. Após retirar o selador de placa, NÃO retorne à área de pré-PCR/PCR no mesmo dia. Se for necessário retornar à área de pré-PCR/PCR, vá para casa primeiro, troque de roupa e tome um banho antes de retornar ao laboratório.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 6 de 15	

- 14.2. Use luvas durante todo o procedimento. Remova as luvas e as descarte antes de sair da área pós-PCR/ELISA.
- 14.3. Sensibilize uma placa (ou o número necessário de poços) com estreptavidina adicionando 100 ul de uma solução de trabalho de 1 ug/ml de estreptavidina diluída em tampão de sensibilização (Coating Buffer) em cada poço. Cubra a placa com selador de placas.
- 14.4. Incube a placa a 4 °C durante a noite.
- 14.5. Descarte o conteúdo dos poços na pia. Lave a placa seis vezes com TBST em temperatura ambiente. Seque a placa entre as lavagens, invertendo a placa entre as lavagens sobre um papel toalha para remover o fluido residual da lavagem.
- 14.6. Adicione 20 ul de tampão de hibridização a cada poço revestido usando pipeta multicanal.
- 14.7. Adicione 5 ul de cada produto de PCR aos poços apropriados.
- 14.8. Incube a placa em temperatura ambiente por 30 minutos.
- 14.9. Durante o período de incubação, prepare a solução de trabalho da sonda OVS2-FL (100 ng/ml em tampão de hibridização).
- 14.10. Esvazie a placa na pia. Lave o poço seis vezes com TBST em temperatura ambiente. Seque a placa entre as lavagens, invertendo a placa entre as lavagens sobre um papel toalha para remover o fluido residual da lavagem.
- 14.11. Adicione 100 ul 1M NaOH a cada poço e incube por um minuto em temperatura ambiente.
- 14.12. Esvazie a placa na pia. Lave o poço seis vezes com TBST em temperatura ambiente. Seque a placa entre as lavagens, invertendo a placa entre as lavagens sobre um papel toalha para remover o fluido residual da lavagem.
- 14.13. Adicione 50 ul da solução de trabalho da sonda OVS2-FL e incube a 42 °C por 15 minutos.
- 14.14. Esvazie a placa na pia. Lave o poço seis vezes com solução TBST em temperatura ambiente. Seque a placa entre as lavagens, invertendo a placa entre as lavagens sobre um papel toalha para remover o fluido residual da lavagem.
- 14.15. Adicione 100 ul de tampão de lavagem SSSPE/SDS aquecido (56 °C) a cada poço.
- 14.16. Incube a placa a 56°C por 10 minutos.
- 14.17. Durante o período de incubação, prepare soluções de trabalho dos fragmentos Fab conjugados com anti-fluoresceína-AP (1 ul da solução estoque em 10 ml de tampão de diluição de anticorpo).

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023		Página 7 de 15

- 14.18. Esvazie a placa na pia. Lave o poço seis vezes com TBST. Seque a placa entre as lavagens, invertendo a placa entre as lavagens sobre um papel toalha para remover o fluido residual da lavagem.
- 14.19. Adicione 50 ul de fragmentos de Fab conjugados com antfluoresceína-AP diluídos a cada poço.
- 14.20. Incube a placa a 37 °C por 15 minutos.
- 14.21. Durante o período de incubação, prepare as soluções de trabalho do sistema de detecção BluePhos misturando volumes iguais de solução A e solução B em tubo de 15 ml. Use até 30 minutos após a mistura. São necessários 10 ml da mistura para uma placa cheia.
- 14.22. Esvazie a placa na pia. Lave o poço seis vezes com solução TBST em temperatura ambiente. Seque a placa entre as lavagens, invertendo a placa entre as lavagens sobre um papel toalha para remover o fluido residual da lavagem.
- 14.23. Adicione 100 ul de solução de BluePhos recém-misturada a cada poço. Bata suavemente para misturar. Incube em temperatura ambiente por 20-30 min. A cor azul começará a aparecer.
- 14.24. Dilua uma parte da solução de parada AP com 9 partes de água de alta qualidade para fazer uma solução de parada 1X em temperatura ambiente.
- 14.25. Para uma placa 1 ml de parada AP + 9ml de H₂O.
- 14.26. Adicione 100 ul de solução de parada AP a cada poço para interromper o desenvolvimento da cor no momento desejado.
- 14.27. Leia as placas a 650 nm.

15. Análises/cálculos

- 15.1. Faça a média de todos os dez poços de controle negativo e determine o desvio padrão dos controles negativos. Adicione um valor igual a três desvios-padrão à média dos poços de controle negativo.
- 15.2. Usamos dois pontos de corte diferentes para o ensaio, dependendo da média mais 3 desvios padrão dos negativos. Se esse valor estiver acima de 0,1, use a média mais 3 desvios padrão como ponto de corte. Se estiver abaixo de 0,1, defina o corte em 0,1. A razão para isso é que, à medida que o profissional realiza o ensaio, sua consistência melhorará, e os poços em branco começarão a mostrar pouca variação. A principal fonte de variação observada quando isso acontece surge do histórico contribuído pelas próprias amostras de DNA, e não da variação no ensaio. Se obtiver espaços em branco

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 8 de 15

muito baixos, o corte não será suficiente para explicar essa fonte subjacente de variação e vários poços pontuarão como falsos positivos. No entanto, essa variação subjacente nunca excede 0,1, portanto, 0,1 é o ponto de corte a ser usado nessa situação.

- 15.3. Qualquer poço com um valor OD abaixo do ponto de corte é pontuado como negativo, e qualquer um com valor acima do ponto de corte é pontuado como um suposto positivo. Quando um suposto positivo for detectado, repita todo o ensaio para as amostras putativas positivas, começando com uma nova reação de PCR. Qualquer amostra que pontue acima do ponto de corte em dois PCRs independentes é pontuada como positiva confirmada.

- 16. Valores de referência/valores de alerta**
Não aplicável.

- 17. Interpretação dos resultados**

- 18. Análise dos dados das placas experimentais:**

Faça a média de todos os dez poços de controle negativo e determine o desvio padrão dos controles negativos. Adicione um valor igual a três desvios-padrão à média dos poços de controle negativo.

São utilizados dois pontos de corte diferentes para o ensaio, dependendo da média mais 3 desvios padrão dos negativos. Se esse valor estiver acima de 0,1, use a média mais 3 desvios padrão como ponto de corte. Se estiver abaixo de 0,1, defina o corte em 0,1. A razão para isso é que, à medida que o profissional realiza o ensaio, sua consistência melhorará, e os poços em branco começarão a mostrar muito pouca variação. A principal fonte de variação observada quando isso acontece surge do histórico contribuído pelas próprias amostras de DNA, e não da variação no ensaio. Se obtiver espaços em branco muito baixos, o corte não será suficiente para explicar essa fonte subjacente de variação e vários poços serão pontuados como falsos positivos. No entanto, essa variação subjacente nunca excede 0,1, portanto, 0,1 é o ponto de corte a ser usado nessa situação.

Observe os valores de OD nos poços de controle positivo (A11 e A12). Ambos devem estar acima do ponto de corte positivo, conforme determinado acima. É normal que o poço que contém o DNA do simulídeo seja um pouco menor do que o poço sem o DNA do simulídeo, mas ambos devem estar acima do ponto de corte para que o resultado na placa seja válido. Qualquer poço com um valor OD abaixo do ponto de corte é

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023		Página 9 de 15

pontuado como negativo, e qualquer um com valor acima do ponto de corte é pontuado como um suposto positivo. Quando um suposto positivo for detectado, repita todo o ensaio, começando com uma nova reação de PCR. Qualquer amostra que pontue acima do ponto de corte em dois PCRs independentes é pontuada como positiva confirmada para O-150. Amostras de DNA positivas confirmadas devem ser enviadas ao laboratório Unnasch para confirmação independente.

Todos os poços de controle negativo e as extrações simuladas de DNA (SHAM) devem ter valores de OD no nível de base (ou seja, inferiores a 0,1). Se algum dos poços de controle negativo ou alguma das extrações simuladas tiver valores de OD positivos, é uma indicação de que há contaminação em seu sistema em algum lugar. Se as reações simuladas (SHAM) forem positivas e as reações de controle negativo forem todas negativas, isso aponta para contaminação no processo de extração de DNA. Se um controle negativo for positivo, provavelmente existe contaminação no processo de PCR. Os problemas de contaminação são muito difíceis de diagnosticar e corrigir. Entre em contato com o laboratório de referência para obter orientação sobre como identificar a fonte de contaminação e corrigir o problema.

19. Revisão e aprovação de resultados

Os dados laboratoriais serão verificados e assinados pelos profissionais que conduziram o ensaio. Os resultados serão então revisados pelo supervisor do laboratório. O diretor do laboratório analisará e aprovará os resultados.

20. Relatório de resultados; Diretrizes para notificação

Insira os resultados no sistema de rastreamento de arquivos designado pelo laboratório. Relate os resultados de acordo com os procedimentos de relatório de laboratório ao remetente.

21. Retenção e armazenamento de amostras

O DNA extraído e o DNA restante serão devidamente rotulados e armazenados no congelador designado a -70 °C por um período mínimo de três anos.

22. Gerenciamento de registros

O registro do procedimento de todas as etapas do processo devem ser mantidas no laboratório, conforme descrito em seus sistemas de gestão da qualidade. Esses registros devem estar prontamente disponíveis para auditoria ou revisão em todos os momentos.

23. Referências

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 10 de 15	

- 23.1. 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)). Acessado em 3 de abril de 2023

24. Anexos/apêndices

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 11 de 15	

Apêndice 1

Preparação de 10x TBS:

1. Dissolva 30,2 g de tris base e 43,8 g de NaCl em 350 ml de água deionizada ou destilada.
2. Ajuste o pH para 7,5 com HCl. Ajuste o volume para 500 ml.
3. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 2

Preparação de 1 L de TBST:

1. Meça e misture
 - a. 10x TBS 100 ml
 - b. Tween 20 0,5 ml
 - c. Água destilada ou desionizada para 1 litro (aproximadamente 900 ml)

Nota: o Tween 20 é muito viscoso e pode ser difícil de pipetar com precisão. Para diluí-lo, aqueça-o por um curto período no micro-ondas ou na incubadora a 56 °C.

2. Conserve em frascos de esguicho
3. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 3

Preparação do tampão de revestimento:

1. Prepare 50 mM de NaHCO_3 , 2mM de Na_2CO_3 .
 - a. 4,2 g de bicarbonato de sódio
 - b. 0,211 g de carbonato de sódio
 - c. Dissolva para fazer um litro
2. Faça o tampão de revestimento fresco semanalmente à medida que o pH diminui durante o armazenamento.
3. Rotule com data de validade de 1 semana e armazene a 4 °C

Apêndice 4

Preparação do tampão de hibridização

1. Faça uma solução de estoque de 500 ml usando as seguintes soluções:

Reagente	Valor a adicionar
20X SSPE	120 ml
10X Denhardt	50 ml
1% (p/v) de N-lauril sarcosina	50 ml
10% SDS	1 ml
água destilada ou desionizada	279 ml

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023		Página 12 de 15

2. Rotule, autoclave e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 5

Preparação da sonda OVS2-Fl:

5' AATCTCAAAAAACGGGTACATA-fl 3' em que fl = fluoresceína.

1. Ao receber esse insumo, a folha de especificações deverá indicar a quantidade exata que enviada em microgramas.
2. Dissolva toda a quantidade em tampão de hibridização suficiente para obter uma solução estoque de 100x de 10 ug/ml. Divida a solução estoque 100x em alíquotas de 55 ul cada e armazene-as a -70 °C.
3. Para preparar a solução de trabalho, retire uma alíquota do congelador, descongele e adicione 5,45 ml de tampão de hibridização. Isso produzirá 5,5 ml de solução de trabalho, o suficiente para fazer uma placa cheia.
4. Armazene qualquer solução de trabalho não utilizada a -20 °C e use em até um mês.

Apêndice 6

Preparação de 20X SSPE:

1. Dissolva
 - a. 174 g de NaCl,
 - b. 27,6 g de NaH₂PO₄,
 - c. 7,4 g de EDTA dissódico
 - d. em 700 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o pH para 7,4 com NaOH.
3. Ajuste o volume para 1 litro.
4. Armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 7

Preparação de 10X Denhardt

1. Pese 0,2 g de cada um dos três ingredientes abaixo e dissolva-os em 100 ml de água destilada ou deionizada.
2. 0,2% (p/v) de albumina de soro bovino
3. 0,2% (p/v) de polivinilpirrolidona
4. 0,2% (p/v) de Ficoll 400
5. Rotule e armazene a -20 °C

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023		Página 13 de 15

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005	Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 14 de 15	

Apêndice 8

Preparação de N-lauril sarcosina a 1%

1. Dissolva 1g de N-lauril em 80 ml de água destilada ou deionizada.
2. Ajuste o volume para 100 ml
3. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 9

Preparação de SDS a 10%:

1. O SDS é muito leve, e os cristais são muito irritantes se inalados. Use uma máscara contra poeira ao pesar.
2. Dissolva 100 g de SDS em 800 ml de água destilada ou deionizada.
3. Ajuste o volume final para 1 litro.
4. Rotule e armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 10

Preparação do tampão de lavagem SSPE/SDS:

1. Meça e misture:
 - a. 20X SSPE 5 ml
 - b. 10% SDS 1 ml
 - c. Água destilada ou deionizada 94 ml
2. Rotule e armazene a 56 °C.

Apêndice 11

Preparação do tampão de diluição de anticorpos

1. Meça e misture o seguinte:

Reagente	Valor a adicionar
4M NaCl	10 ml
1M Tris HCl (pH 7,5)	10 ml
BSA	0,5 g
água destilada ou deionizada.	80 ml

2. Rotule e armazene a -20 °C

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Detecção baseada em ELISA de produtos de PCR O-150				
Doc. Nº. USF-005		Rev. Nº. Nova	Data de vigência: 05/15/2023	Página 15 de 15

25. Histórico de revisões

Rev nº	3DCR #	Alterações feitas no documento	Data
Nova		Novo documento	

26. Assinaturas de aprovação

Aprovado por: _____
 Autor Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Revisor SME Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Laboratório de Referência de Data
 Oncocercose da USF

5. USF-006 Protocolo ELISA para *E. Coli*– Detecção de anticorpos para aceitação de amostras

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 1 de 11

1. Objetivo

Este documento descreve a detecção de anticorpos contra *Escherichia coli* em amostras de sangue seco coletadas de crianças menores de 15 anos de idade. A determinação se uma amostra é positiva é feita com base no teste ELISA.

2. Âmbito

Este procedimento aplica-se aos laboratórios que pertencem à Rede de Diagnóstico Laboratorial de Oncocercose gerida pelo USFCC.

Para que os resultados do ensaio ELISA Ov16 sejam válidos, as manchas de sangue seco (DBS) que foram coletadas devem conter anticorpos ativos. As DBS são estáveis por períodos relativamente longos (por exemplo, dias) em temperatura ambiente, mas são muito suscetíveis à degradação se não são mantidas completamente secas. Assim, antes de iniciar a análise de DBS para anticorpos Ov16, é necessário determinar se a DBS ainda contém anticorpos ativos. Faça isso testando primeiro uma seleção aleatória de DBS para a presença de anticorpos contra *Eschereria coli*. *E. Coli* é uma bactéria encontrada universalmente em nossos intestinos e é uma fonte comum de infecções (de cortes ou do trato urinário), pois as fezes contêm grandes quantidades de *E. Coli*. Assim, os anticorpos para *E. coli* são quase universais. Este protocolo descreve como detectar anticorpos de *E. Coli* nas manchas de sangue eluídas.

Se o protocolo for executado em um laboratório que também esteja executando o O150 PCR ELISA para detectar a presença de *O. volvulus* L3 em vetores, o ELISA Ov16 deverá ser realizado na área pós-PCR em que o leitor de placas ELISA está localizado.

Pipetadores pós-PCR podem ser compartilhados entre os protocolos PCR ELISA e ELISA. No entanto, é importante **NÃO** trabalhar na área de pré-PCR/PCR depois de ter feito um ELISA Ov16, pois haverá risco de contaminação ao passar da área de pós-PCR para a área de pré-PCR/PCR, conforme discutido no protocolo O150 PCR ELISA.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 2 de 11

3. Documentos relacionados

Título	Número de controle do documento
Manual externo de garantia de qualidade	USF-001
Protocolo ELISA Ov16 (versão OEPA) – Detecção de anticorpos contra <i>O. volvulus</i>	USF-002

4. Responsabilidade

Posição	Deveres
Equipe técnica do laboratório	- Estar conformidade com as políticas e procedimentos do laboratório - Ler e entender o protocolo - Realizar testes de acordo com o protocolo - Registrar os resultados de acordo com o protocolo
Supervisor	- Desenvolver e implementar políticas, processos e procedimentos para garantir que todas as funções críticas do laboratório sejam realizadas sob condições controladas - Certificar-se de que toda a equipe técnica esteja treinado e tenha experiência - Revisar e aprovar resultados

5. Definições

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

USF: University of South Florida

MDP: Programa de doação Mectizan

USFCC: Laboratório de Referência de Oncocercose da USF

6. Equipamentos/Materiais (se aplicável)

Item
Congelador -70 °C
Congelador -20 °C
Geladeira 4 °C
Leitor de placas ELISA capaz de ler a 405 nm
Balança de carga superior com precisão de 10 mg
Balança analítica com precisão de 0,1 mg

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 3 de 11

Medidor de pH
Misturador de vórtice
Placa de agitação magnética e agitadores
Micropipetas ajustáveis de 1-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL
Micropipeta multicanal de 20-200 µL (8 ou 12 canais)
Garrafas de esguicho de 500 ml
Perfurador para notebook de ¼"

7. Reagentes e suprimentos

Item	Fornecedor recomendado	Número de catálogo
Luvas de látex ou nitrilo	Qualquer	
Ponteiras de barreira de aerossol (20 ul, 200 ul, 1000 ul)	Qualquer	
Filme selador de placas	Qualquer ou Fisher	3501
Sacos de plástico Ziplock de 1 litro	Qualquer	
Placas de poliestireno de 96 poços para eluição DBS	Qualquer ou Fisher	3370
Placas de fundo plano Immunolon 2HB	Fischer	3455
Toalhas de papel	Qualquer (local)	
Reservatórios de reagentes de 50 ml	Qualquer	
Tampão de revestimento	Preparado em laboratório	
Antígeno de <i>E. Coli</i>	USFCC	
Antígeno GST	USFCC	
Conjugado de IgG AP anti-humano de cabra	Jackson Immuno Research	109-055-003
Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Preparado em laboratório	
PBST	Preparado em laboratório	
PBST-BSA	Preparado em laboratório	
Kit de substrato e tampão de pNPP	Fischer	37620
Cloreto de sódio (NaCl)	Qualquer	
Cloreto de potássio (KCl)	Qualquer	
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	Qualquer	
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Qualquer	
Tween 20	Qualquer	
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Qualquer	

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 4 de 11

Albumina de soro bovino, fração V (BSA)	Recomendado de Sigma	
Hidróxido de sódio (NaOH)	Qualquer (obtido localmente)	
Solução de parada	Preparado em laboratório	

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras				
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 5 de 11	

8. Suprimentos, outros materiais

Item
Não aplicável

9. Precauções de segurança

- 9.1. Os procedimentos devem ser realizados em conformidade com todas as políticas e procedimentos de segurança institucionais, de acordo com o a 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)).
- 9.2. **Equipamento de proteção pessoal:** proteção para os olhos, luvas e jaleco devem ser usados o tempo todo
- 9.3. **Requisitos de contenção:** aplicam-se precauções universais
- 9.4. **Resposta a derramamento:** n/a
- 10. Coleta, armazenamento, preservação e transporte de amostras:** os espécimes serão manchas de sangue seco, separadas individualmente, armazenadas em sacos plásticos com dessecante de sílica e um indicador de cor de umidade.
- 10.1. Todos os lotes de DBS a serem testados devem estar em conformidade com os critérios de teste de aceitação:
- 10.2. Embalagem adequada da bolsa: bolsa intacta, totalmente etiquetada, devidamente selada, presença de dessecante com indicador de cor representando seco, indicador de umidade do cartão mostrando <20% de umidade.
- 10.3. Cada bolsa do lote devidamente identificada com uma planilha de acompanhamento para identificar todas as amostras
- 10.4. Se esses requisitos não forem atendidos, as bolsas não poderão ser processadas posteriormente para teste. O remetente será notificado, e as bolsas serão devolvidas ao remetente.
- 11. Obtenção de espécimes:** o laboratório de testes insere as informações do lote em um documento mestre do Excel "Ov16 ELISA". Cada lote de amostras receberá um identificador exclusivo que permite o rastreamento de amostras e lotes.
- 12. Controle de qualidade**
Controles positivos e negativos fornecidos pelo USFCC.
- 13. Tabela de fluxo de trabalho ou processo (opcional)**

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 6 de 11

13.1. Indique os números do prédio e da sala onde as amostras serão processadas e o ELISA será lido.

13.2. Indique os números do prédio e da sala onde os congeladores estarão localizados.

14. Procedimento

14.1. Escolha aleatoriamente uma seleção de DBS para testar quanto a anticorpos de *E. Coli*. Deve ser escolhido 10% do número total de amostras de um determinado saco de coleta que foi entregue ao laboratório, ou pelo menos 10 DBS se houver menos de 100 DBS em um saco de coleta. Cada placa ELISA será capaz de analisar 40 amostras neste protocolo (veja abaixo)

14.2. Perfure um ponto das amostras de sangue seco coletadas nos papéis de filtro usando um perfurador de papel padrão de 1/4". Usando seu mapa, coloque os punções duplicados das manchas de sangue nos poços de uma placa de eluição DBS de 96 poços. Adicione 200 µL de PBST-BSA a cada amostra. Empurre os punções para o fundo do poço e misture 10 vezes pipetando. Cubra as placas com um selador de placas e incube a 4 °C durante a noite. Conserve as amostras de soro eluído a curto prazo (até duas semanas) a 4 °C e a longo prazo a -20 °C. Minimize o número de ciclos de congelamento e descongelamento.

14.3. Prepare duas soluções de antígeno para revestir a placa: uma solução de 2 µg/ml de antígeno de *E. coli* em tampão de revestimento e a segunda contendo 2 µg/ml de BSA.

14.4. De acordo com o mapa abaixo, adicione 100 µL de cada solução de revestimento conforme indicado aos poços de uma placa Immulon II HB, revestindo as colunas 1-6 com BSA e 7-12 com antígeno de *E. Coli*. Sele a placa e incube a 4°C durante a noite.

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

S= DBS (amostra)

BLK= Em branco (nenhum soro será adicionado)

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 7 de 11

- 14.5. Lave as 4 vezes com PBST, usando uma garrafa de esguicho. Não seque entre as lavagens. Seque a placa em uma pilha de toalhas de papel após a última lavagem.
- 14.6. Adicione 100 µL de PBST-BSA a cada poço e incube a 4 °C por 1 hora.
- 14.7. Após a incubação, retire a placa da geladeira e descarte o tampão. Não lave a placa, mas bata em uma pilha de toalhas de papel para secar.
- 14.8. Adicione 50 µL de DBS eluído em duplicata a cada poço de acordo com o mapa. Para espaços em branco, adicione PBST-BSA.
- 14.9. Feche a placa e incube em temperatura ambiente por 2 horas.
- 14.10. Lave as placas quatro vezes com PBST. Após a lavagem final, bata a placa em papel toalha para secar.
- 14.11. Adicione 50 µL de IgG anti-humano de cabra conjugado com AP diluído 1:5000 em PBST a cada poço. Feche a placa e incube em temperatura ambiente durante uma hora.
- 14.12. Lave as placas quatro vezes com PBST. Após a lavagem final, bata a placa em papel toalha para secar.
- 14.13. Prepare a solução pNPP com o tampão de substrato dissolvendo 1 comprimido em 5 ml de tampão de substrato 1X. Adicione 50 µl para cada poço. Incube em temperatura ambiente coberto com papel alumínio ou em uma gaveta por 20-30 minutos.
- 14.14. Adicione 25 µL de solução de parada (NaOH 3M) a cada poço e leia a placa imediatamente a 405 nm.

15. Controle de qualidade

Os poços em branco e os poços revestidos com BSA devem ter valores de OD de 0,1 ou menos.

16. Análises/cálculos

Uma amostra é classificada como positiva para anticorpos de *E. coli* se o OD no poço revestido de *E. coli* for 5 vezes ou mais que o OD observado no poço revestido de BSA correspondente.

Pelo menos 70% das amostras de uma bolsa de coleta devem ser positivas para anticorpos de *E. Coli*. Um nível mais baixo de reatividade para *E. Coli* sugere que os DBS estavam estragados, e todas as amostras na bolsa não devem ser usadas no ELISA Ov16. O remetente será notificado, e a bolsa com seu conteúdo será devolvida ao remetente.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 8 de 11

17. Valores de referência/valores de alerta

Não aplicável.

18. Revisão e aprovação de resultados

Os resultados laboratoriais serão avaliados pelo supervisor do laboratório e pelo diretor.

19. Relatório de resultados; Diretrizes para notificação

Insira os resultados no sistema de rastreamento de arquivos designado pelo laboratório. As bolsas que passarem no teste poderão ser testadas posteriormente. Os resultados das bolsas com falha serão processados de acordo com os procedimentos de relatório do laboratório para o remetente.

20. Retenção e armazenamento de amostras

O DBS eluído e o DBS restante serão devidamente rotulados e armazenados no freezer designado.

21. Gerenciamento de registros

O registro do procedimento de todas as etapas do processo devem ser mantidas no laboratório, conforme descrito em seus sistemas de gestão da qualidade. Esses registros devem estar prontamente disponíveis para auditoria ou revisão em todos os momentos.

22. Referências

- 22.1. 6ª edição da Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos (BMBL) do CDC ([Biossegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos \(BMBL\) 6ª Edição | Portal de Laboratório CDC | CDC](#)). Acessado em 3 de abril de 2023

23. Anexos/apêndices

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 9 de 11

Apêndice 1

Preparação do tampão de revestimento (0,1 M NaHCO₃, pH 9,6):

1. Dissolva 8,4 g de NaHCO₃ em 900 ml de água destilada ou deionizada.
2. Verifique o pH da solução com o medidor de pH. O pH deve estar entre 9,5-9,7.
3. Adicione água para atingir um volume final de 1 litro.
4. Rotule incluindo preparação e data de validade (7 dias após a preparação). Armazene a 4 °C por no máximo uma semana.

10X PBS:

1. Peso:

- NaCl 80 g
- KCL 2,0 g
- KH₂PO₄ 2,4 g
- Na₂HPO₄ 14,4 g

2. Dissolva todos os ingredientes em 800 ml de água destilada ou deionizada e ajuste o volume final para 1L.
3. Verifique o pH com o medidor de pH. O pH deve estar entre 7,0-7,4.
4. Rotule com a preparação e a data de validade. Armazene em temperatura ambiente.

Apêndice 2

Preparação do PBS Tween (PBST):

1. Meça e misture:

10X PBS 100 ml
 Tween 20 0,5 ml
 Água destilada ou deionizada 900 ml

Nota: o Tween 20 é muito viscoso e pode ser difícil de pipetar com precisão. Para facilitar, dilua-o aquecendo-o por um curto período no micro-ondas, na incubadora a 56 °C ou em banho-maria.

2. Rotule com a preparação e a data de validade. Conserve em uma garrafa de esguicho em temperatura ambiente.

Apêndice 3

Preparação do PBST-BSA

1. Dissolva 5 g de BSA em 100 ml de PBST.

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF		
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras			
Doc. Nº. USF-006	Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 10 de 11

2. Rotule com a preparação e a data de validade.
3. Armazene a 4 °C

Solução de parada (3M NaOH)

1. Dissolva 12 g de NaOH em 80 ml de água desionizada ou destilada.
2. Ajuste o volume final para 100 ml.
3. Rotule com a preparação e a data de validade.
4. Armazene em temperatura ambiente.

24. Histórico de revisões

Rev nº	3DCR #	Alterações feitas no documento	Data
Nova		Novo documento	

25. Assinaturas de aprovação

Aprovado por: _____
 Autor Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Revisor SME Data

 Imprimir nome e título

Aprovado por: _____
 Laboratório de Referência de Oncocercose da USF Data

 Imprimir nome e título

USFCC	Laboratório de Referência de Oncocercose da USF			
Protocolo ELISA <i>para E. Coli</i> – Detecção de anticorpos para aceitação de amostras				
Doc. Nº. USF-006		Rev. Nº. Novo	Data de vigência: 15/05/2023	Página 11 de 11