

---

Desarrollo de protocolo para la detección y análisis de anticuerpos IgG e IgG4 a los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de *Onchocerca volvulus* por ensayo múltiple de fluorescencia

---

Estefani Carolina Quesada Chávez



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Desarrollo de protocolo para la detección y análisis  
de anticuerpos IgG e IgG4 a los  
antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de  
*Onchocerca volvulus* por ensayo múltiplex de  
fluorescencia**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Estefani Carolina Quesada Chávez  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,  
2020



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

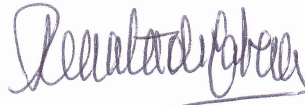


**Desarrollo de protocolo para la detección y análisis  
de anticuerpos IgG e IgG4 a los  
antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de  
*Onchocerca volvulus* por ensayo múltiplex de  
fluorescencia**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Estefani Carolina Quesada Chávez  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,  
2020

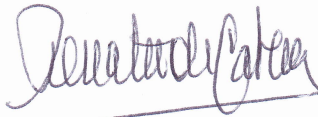
Vo. Bo.:



(f)

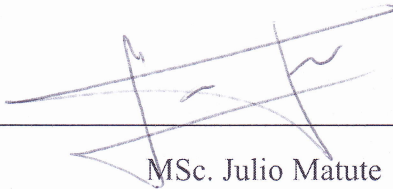
MSc. Renata Mendizábal de Cabrera

Tribunal Examinador:



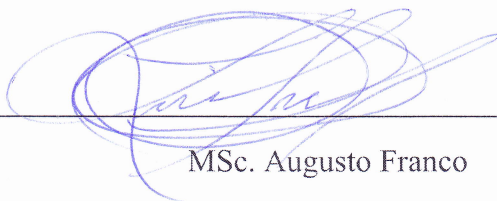
(f)

MSc. Renata Mendizábal de Cabrera



(f)

MSc. Julio Matute



(f)

MSc. Augusto Franco

Fecha de aprobación: Guatemala, 8 de diciembre de 2020

---

## Agradecimientos

---

A mis padres y hermanos: Miriam Chávez, Rene Quesada, Jean Paule, Franklin y Cristian, por su apoyo, amor, paciencia y constantes enseñanzas a cerca de la vida.

A Laly Contreras, Matthew Quesada, Mario Daniel Quesada y Juana Perez por enseñarme a no tomar la vida tan enserio y siempre ver el lado positivo.

A mi asesora, Renata Mendizábal por ser una persona admirable y permitirme trabajar con ella mis prácticas profesionales junto con mi trabajo de graduación. Gracias por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A Vitaliano Cama, por el apoyo durante la elaboración de mi trabajo de graduación y facilitarme la base de datos utilizada para verificar mi algoritmo.

A los catedráticos del Departamento de Bioquímica y Microbiología, que a través de sus enseñanzas e iniciativas han sido parte de mi formación académica y personal durante estos cinco años. Con una mención especial hacia PhD. Dalia Lau, que ha sido una catedrática y ser humano excepcional conmigo.

A mi directora de carrera, PhD Pamela Pennington por ser una gran entusiasta de la ciencia y por siempre buscar iniciativas en las cuales los estudiantes puedan participar. Además de su asesoramiento durante la elaboración de mi trabajo de graduación.

A mis compañeras de promoción: Ana Lucía Vázquez, Marcela Morales, Javier Santos, Mariana Pira, Paola Ortiz, Mateo Alvarado por haber compartido conmigo estos cinco años y enseñarme tantas cosas en el camino. Especialmente a las biotecnologas por su amistad, ustedes son una cosa pero bárbara.

A mis amigos licenciados en física Pedro Valdes, Paolo Marsicovetere y Marcos Gutierrez por su amistad incondicional y por siempre estar para mí.

<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de cuadros</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract</b>	<b>IX</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>2</b>
2.1. Objetivo general . . . . .	2
2.2. Objetivos específicos . . . . .	2
<b>3. Justificación</b>	<b>3</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>5</b>
4.1. Generalidades de la enfermedad . . . . .	5
4.2. Ciclo de vida del parásito . . . . .	5
4.2.1. Insecto vector . . . . .	5
4.2.2. Hospedero mamífero . . . . .	6
4.3. Distribución . . . . .	7
4.3.1. Nivel mundial . . . . .	7
4.3.2. América . . . . .	7
4.3.3. Guatemala . . . . .	8
4.3.4. Vectores . . . . .	8
4.4. Animales reservorios . . . . .	9
4.5. Tratamiento de la Oncocercosis . . . . .	9
4.6. Diagnóstico . . . . .	11
4.6.1. Métodos moleculares . . . . .	12
4.6.2. Control de calidad (CC) . . . . .	15
4.6.3. Análisis estadístico . . . . .	15
4.6.4. Parámetros de validación . . . . .	16
4.7. Vigilancia epidemiológica post eliminación de la oncocercosis . . . . .	16
4.7.1. Lineamientos de la OMS . . . . .	16
4.7.2. Protocolos establecidos en países latinoamericanos . . . . .	17

<b>5. Metodología</b>	<b>18</b>
5.1. Procedimiento . . . . .	18
5.1.1. Elaboración de procedimientos normados de operación (PNO) . . . . .	18
5.1.2. Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX® . . . . .	18
5.1.3. Acoplamiento del antígeno a las microesferas . . . . .	20
5.1.4. Verificación del acoplamiento del antígeno . . . . .	20
5.1.5. Inmunoensayo múltiplex para la detección de <i>O. volvulus</i> con microesferas acopladas con antígenos recombinantes . . . . .	20
5.1.6. Análisis e interpretación de resultados . . . . .	21
5.1.7. Validación de pipeline de análisis y flujograma . . . . .	22
5.1.8. Aspectos éticos . . . . .	22
<b>6. Resultados</b>	<b>23</b>
6.1. PNO . . . . .	23
6.2. Análisis de curva ROC . . . . .	23
6.3. Distribución de los datos . . . . .	24
6.4. Parámetros de validación . . . . .	26
<b>7. Discusión</b>	<b>28</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>9. Recomendaciones</b>	<b>31</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>32</b>
<b>11. Anexo</b>	<b>38</b>
A. PNO . . . . .	38
B. Gráficos de R . . . . .	86

---

## Lista de figuras

---

4.1. Ciclo de vida de <i>O. volvulus</i> . . . . .	6
4.2. Distribución mundial de oncocercosis 2017 . . . . .	7
4.3. Ciclo de vida de la <i>Simulium</i> spp . . . . .	9
4.4. Combinación de tintes en las microesferas . . . . .	13
4.5. Funcionamiento general del Ensayo Múltiplex de Perlas . . . . .	14
5.1. Flujo de trabajo para llevar a cabo un inmunoensayo usando el equipo Luminex® MAGPIX® . . . . .	19
5.2. Reacción de carbodiimida . . . . .	20
6.1. Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anti- cuerpos IgG4 con microesferas acopladas con OV16 . . . . .	24
6.2. Diagramas de caja y bigote de la distribución de las repuestas de anticuerpos para los tres antígenos de <i>O. volvulus</i> . . . . .	25
6.3. Gráfico Q-Q de la respuesta de anticuerpos IgG4 al antígeno OV16 . . . . .	26

---

## Lista de cuadros

---

6.1. Título de PNO y ubicación . . . . .	23
6.2. Características de los ensayos de anticuerpos contra los antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i> . . . . .	24
6.3. Parámetros de validación de cada ensayo múltiplex de antígeno-anticuerpo . . . . .	26
6.4. Comparación valores reportados y valores teóricos de cada ensayo múltiplex de antígeno-anticuerpo . . . . .	27

La oncocercosis, también conocida como ceguera del río, es una enfermedad tropical desatendida (ETD) transmitida por la mosca negra *Simulium* sp. y causada por el nemátodo *Onchocerca volvulus*, en el pasado esta se encontraba distribuida a lo largo de América Latina y África, pero gracias a los diferentes programas de control y monitoreo se ha logrado eliminar su transmisión en diferentes países. Guatemala desde el 2016 forma parte de esta lista, sin embargo aún existe la probabilidad de una reemergencia o reintroducción a causa de las migraciones hacia el país. Para evitar esto la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomienda la implementación de instrumentos altamente sensibles y específicos como parte de la vigilancia epidemiológica post-eliminación de la transmisión. Es por ello que en la presente investigación se desarrolló un protocolo para la detección y análisis de anticuerpos IgG e IgG4 específicos para el antígeno recombinante OV16, OV17 y OV33 de *O. volvulus* por ensayo múltiple usando la tecnología Luminex®. Se desarrollaron protocolos normados de operación para cada uno de los procedimientos claves de la preparación y detección de los anticuerpos utilizando el equipo Luminex® MAGPIX® siguiendo los lineamientos establecidos por WHO. Además, se elaboró un algoritmo en R para el análisis e interpretación de resultados, su funcionalidad se evaluó utilizando una base de datos con 610 resultados de pacientes con ETDs, incluyendo oncocercosis, recolectados a nivel mundial en varios estudios. El algoritmo elaborado fue capaz de analizar los resultados de una corrida de proveniente de un ensayo múltiple. Se recomienda realizar la validación de los protocolos elaborados para la implementación del ensayo como una herramienta para la vigilancia de oncocercosis en el país.

Onchocerciasis, also known as river blindness, is a neglected tropical disease (NTD) transmitted by the black fly *Simulium* sp. and caused by the nematode *Onchocerca volvulus*, in the past it remained distributed throughout Latin America and Africa, but with the implementation of different control and monitoring programs, its transmission has been eliminated in different countries. Guatemala has been part of this list since 2016, however there still exists the probability of a re-emergence or reintroduction due to migration to the country. To avoid this, the World Health Organization (WHO) recommends the implementation of highly sensitive and specific instruments as part of the epidemiological surveillance post-elimination of transmission. That is why in the present research, was developed a protocol for the detection and analysis of IgG and IgG4 antibodies specific for the recombinant OV16, OV17 and OV33 antigen of *O. volvulus* by multiplex assay using Luminex® technology. Normative operating protocols were developed for each key procedures in preparation and detection of antibody using the Luminex® MAGPIX® technology, following the guidelines established by the WHO. In addition, an algorithm was developed in R for the analysis and interpretation of results, its functionality was evaluated using a database with 610 results of patients with NTDs, including onchocerciasis, collected worldwide in several studies. The algorithm developed was able to analyze the results of a multiplex assay run. It is recommended to carry out the validation of the protocols developed for the implementation of the trial as a tool for the surveillance of onchocerciasis in the country.

Este trabajo de investigación tuvo como finalidad el desarrollo de un protocolo para la detección y análisis de anticuerpos IgG e IgG4 específicos para el antígeno recombinante OV16, OV17 y OV33 de *Onchocerca volvulus* por ensayo múltiplex. En la actualidad la transmisión de la oncocercosis se encuentra eliminada del país sin embargo, es una enfermedad que aún no se ha logrado erradicar del mundo por lo que se corre un riesgo de reintroducción o reemergencia. Aquí es donde entra la elaboración de protocolos para la vigilancia epidemiológica post-eliminación, que tienen como objetivo la detección temprana de una infección y su posterior tratamiento. La herramienta utilizada para su detección es el ELISA OV16, considerado como el estándar de oro, pero ha surgido la necesidad de implementar instrumentos más sensibles y de mayor alcance como un ensayo múltiplex. Esta permite el análisis y detección de múltiples analitos de manera simultánea dentro de un mismo volumen de muestra; en Guatemala no existe ningún registro de su implementación o uso como herramienta de vigilancia epidemiológica. Por eso se desarrollaron protocolos tanto para los procedimientos claves involucrado en la detección de los anticuerpos descritos con anterioridad utilizando el equipo Luminex® MAGPIX ®, como para aquellos comprendidos en el análisis de respuesta de los anticuerpos.

Los protocolos elaborados siguieron los lineamientos y recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, utilizando el formato establecido por el laboratorio de Leishmaniasis y Oncocercosis del Centro de Estudios en Salud (CES). Además, se elaboró un algoritmo en R para el análisis e interpretación de resultados cuyo funcionamiento fue evaluado al someter una base de datos de oncocercosis y otras parasitosis, el despegamiento correcto de todos los estadísticos y gráficas confirmó su funcionamiento y poder de análisis. Se logró elaborar el protocolo para el acoplamiento del antígeno OV16, OV17 y OV33 de *O. volvulus* a las microesferas xMAP®, mismo que puede ser modificado para el acoplamiento de otros antígenos característicos de ETDs de la región. Esto tiene grandes implicaciones sobre el sistema de vigilancia, pues puede ser utilizado como una plataforma para la detección de múltiples enfermedades endémicas.

### 2.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la detección y análisis de anticuerpos IgG e IgG4 específicos para los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de *Onchocerca volvulus* por ensayo múltiplex.

### 2.2. Objetivos específicos

- Elaborar Protocolos Operacionales Estandarizados para el acoplamiento de los antígenos OV16, OV17 y OV33 de *Onchocerca volvulus* a las microesferas xMAP®.
- Elaborar Protocolos Operacionales Estandarizados para las condiciones de corrida del ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4, contra los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de *Onchocerca volvulus*.
- Elaborar Protocolos Operacionales Estandarizados y un código en R para el análisis de los resultados en el equipo múltiplex MagPix®.

Las enfermedades tropicales desatendida (ETD) son un conjunto de enfermedades transmisibles, en áreas tropicales y subtropicales, que deja severas secuelas a los infectados y la morbilidad ocasionada genera pérdidas económicas para el paciente, su familia y el país. Estas enfermedades requieren tratamientos prolongados, lo que también constituye una carga para los servicios de salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado diferentes iniciativas para la eliminación y control de las ETDs como el dengue, chinkungunya, leishmaniasis y oncocercosis, entre otras. Estos esfuerzos han logrado eliminar la transmisión de algunas ETDs de varios países latinoamericanos.

Una de las ETDs es la oncocercosis o ceguera del río, que es causada por el nematodo *O. volvulus* y transmitida por moscas negras (simúlidos) infectadas. La enfermedad se manifiesta con cambios en la piel (ej. hiperpigmentación, atrofia de la piel), nódulos subcutáneos o afecciones oculares que pueden llegar a ceguera permanente (World Health Organization (WHO), 2019). En Guatemala, desde el 2016, se certificó la eliminación de la transmisión de esta enfermedad en los cuatro focos que tuvo el país. Pero, de acuerdo a los lineamientos de la OMS, para mantener esta certificación es necesario seguir realizando la vigilancia de la enfermedad. Dado que la transmisión ya está eliminada, las herramientas de vigilancia para la detección de una reemergencia o reintroducción de la enfermedad deben de ser mucho más sensibles y específicas (Organización Panamericana de la Salud (PAO), 2018; Takaoka y Suzuki, 2015).

Es por ello que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas herramientas de diagnóstico que puedan incorporarse a las estrategias de vigilancia, especialmente pruebas con una alta sensibilidad que permitan detectar la presencia de anticuerpos en contextos de muy baja transmisión. Este es el caso de poblaciones de áreas que fueron endémicas para la oncocercosis y que están en riesgo de una reintroducción de la enfermedad por poblaciones migrantes de países con transmisión activa u otros (Gustavsen, Hopkins, y Sauerbrey, 2011). El múltiplex, es un ensayo que permite detectar y cuantificar múltiples analitos utilizando volúmenes pequeños de muestra y en tiempos más cortos (Boivin, Côté, Déry, De Serres, y Bergeron, 2004; Breen, Tan, y Khan, 2016; Pedram y cols., 2017). Como inmunoensayo una de sus ventajas es que existe la posibilidad de analizar simultáneamente antígenos para los que podría haber una reacción cruzada con oncocercosis, como otros helmintos transmitidos por el suelo, filarias. Esto es especialmente importante para países de América como Brasil, o de África Central en donde coexisten enfermedades como la oncocercosis y la filariasis linfática (Lagatie y cols., 2018; Wu y cols., 2004).

Esta clase de prueba tiene capacidad de detección de concentraciones pequeñas del analito (pg/ml), lo cual hace que su sensibilidad sea alta. La especificidad dependerá de la molécula de

captura que se esté utilizando. Este tipo de ensayos han servido para estandarizar procedimientos de detección de *Plasmodium falciparum* y *Human orthopneumovirus* (Fonseca y cols., 2017).

## 4.1. Generalidades de la enfermedad

La oncocercosis, o también conocida como ceguera del río, es causada por el gusano nematodo *Onchocerca volvulus* y transmitido por la mordedura de una mosca negra *Simulium* sp. Esta es una enfermedad crónica y progresiva, que se caracteriza por tener períodos asintomáticos largos en los hospederos (Burton, 2009).

La infección causa afecciones cutáneas cuyas manifestaciones dependen del hospedero y de la etapa de infección. Según Hoerauf, Mand, Adjei, Fleischer, y Büttner (2001), existen cinco tipos de lesiones características en la piel: (1) oncodermatitis papular aguda, pequeñas pápulas que se ubican en las extremidades y provocan picazón, (2) oncodermatitis papular crónica, pápulas hiperpigmentadas que se localizan principalmente en glúteos, cintura, hombros y de picazón menor, (3) oncodermatitis liquenificada, las pápulas presentan picazón extrema, (4) atrofia de la piel, debido a la inflamación crónica el hospedero presenta una pérdida de la elasticidad en el área afectada y (5) despigmentación manchada, se observa sobre todo en antebrazo, torso y dorso de las manos.

Las lesiones oculares se manifiestan en diferentes segmentos del ojo. La presencia del nematodo en la parte anterior del ojo puede causar uveítis anterior, también conocida como iritis, que es la inflamación del globo ocular. La falta de tratamiento promueve el desarrollo de sinequias, cataratas y glaucoma. Todas llevarán a la pérdida permanente de la visión (Enk, 2006; Zouboulis, 2018). Si la afección sucede en el segmento posterior del ojo, puede causar atrofia del epitelio pigmentario de la retina o una neuritis óptica. Algunos síntomas que se presentan antes de la ceguera son: picazón, enrojecimiento, dolor, fotofobia, queratitis difusa y visión borrosa (Enk, 2006).

## 4.2. Ciclo de vida del parásito

### 4.2.1. Insecto vector

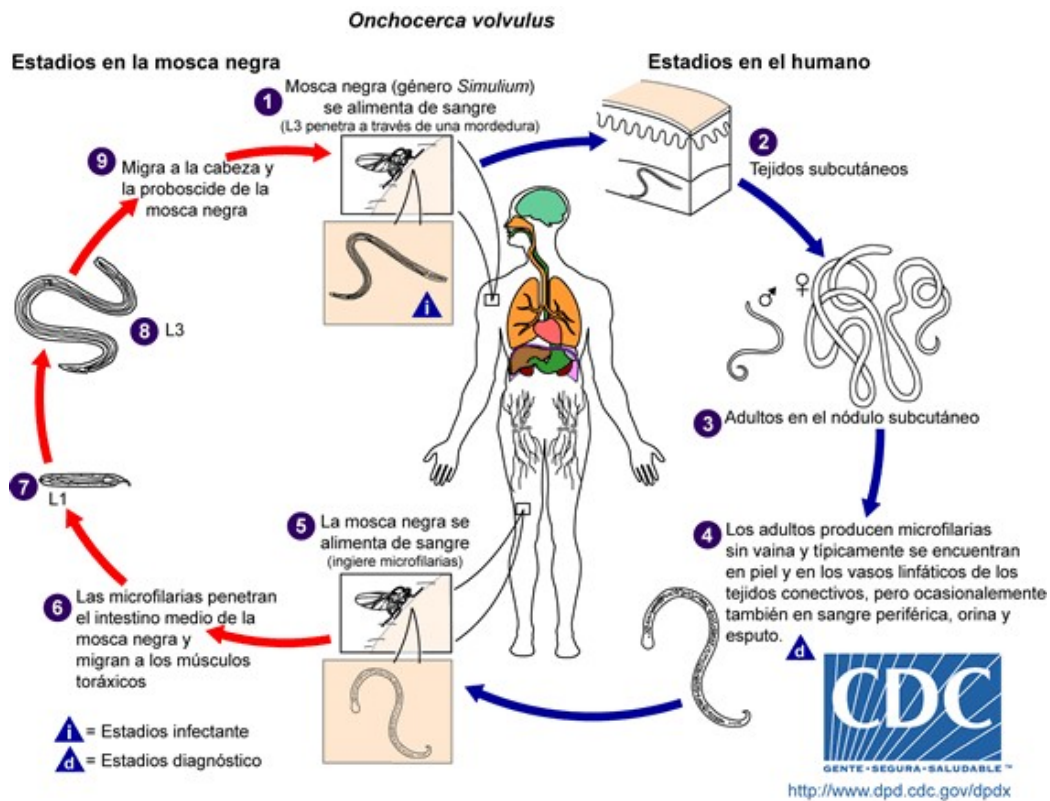
Las hembras de *Simulium* sp. se infectan al ingerir sangre con microfilarias (MF) de una persona infectada. Una vez dentro del simúlido las MF migran hacia los músculos torácicos donde se desarrollan a larvas de primer estadio (L1) y pasan por el segundo estadio (L2) hasta llegar a ser

larvas infectivas de tercer estadio (L3). Este desarrollo sucede en un periodo de 10 a 12 días, una vez completo el desarrollo a larva L3, migra al hemocele y desde allí se dirige a la cabeza para ubicarse en la proboscis del simúlido. Siendo capaz de infectar a un mamífero en su próxima ingesta de sangre (Boatin y Richards Jr, 2006; Higazi y cols., 2005; Hopking y Boatin, 2011).

#### 4.2.2. Hospedero mamífero

El hospedero es infectado una vez el simúlido lo muerde para ingerir sangre, depositando las larvas infectivas de *O. volvulus* que se desplazan a los tejidos subcutáneos. Las MF se alojan en este tejido formando nódulos subcutáneos y continúan su desarrollo hasta gusanos adultos capaces de reproducirse. La hembra se reproduce dentro del nódulo, liberando MF. El tiempo de vida de estas, es de 12 – 15 meses, durante los cuales circularán en: la sangre, orina y esputo del hospedero (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017; E. Cupp, Sauerbrey, y Richards, 2011). Este ciclo puede observarse mejor en la Figura 4.1.

Figura 4.1: Ciclo de vida de *O. volvulus*



(CDC, 2017)

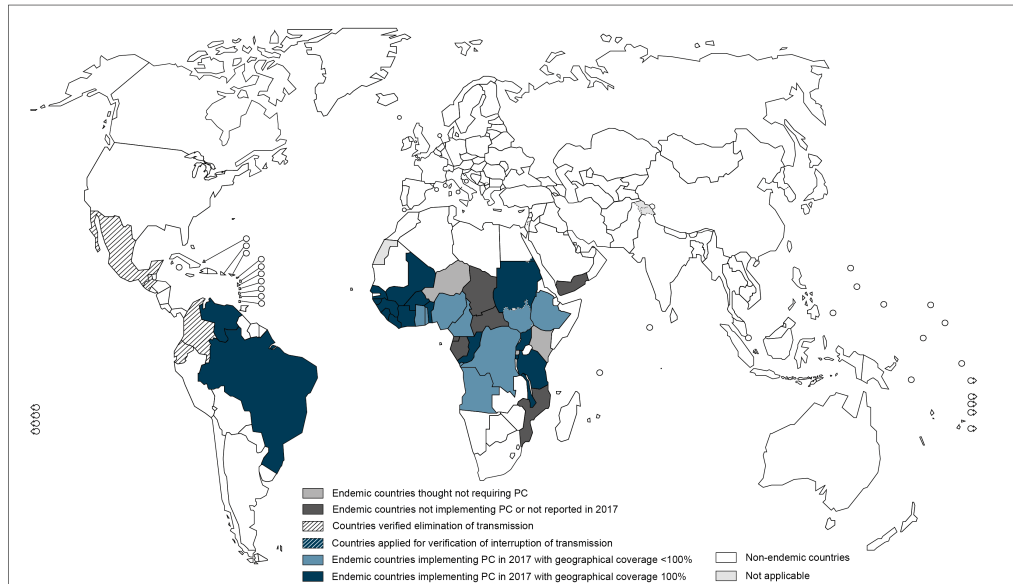
## 4.3. Distribución

### 4.3.1. Nivel mundial

En la actualidad se estima que alrededor de 17 millones de personas se encuentran infectadas de con *O. volvulus* y que alrededor de 198 millones se encuentran en riesgo de contraerla (Lawrence, Joni, Sodahlon, y K, 2018). La mayoría de personas infectadas residen en alguno de los 28 focos del África subsahariana: Angola, Benin, Burkina Faso, Burundi, Camerún, República Centroafricana, Chad, República del Congo, Costa de Marfil, República Democrática del Congo, Guinea Ecuatorial, Etiopía, Gabón, Ghana, Guinea, Guinea-Bissau, Kenia, Liberia, Malawi, Malí, Mozambique, Níger, Nigeria, Ruanda y Senegal (Lawrence y cols., 2018).

También se ha reportado su presencia en Yemen, y en América Latina todavía está presente en el foco Yanomami que comprende Brasil y Venezuela, véase Figura 4.2 (Ono, Hiratsuka, y Murakami, 2010).

Figura 4.2: Distribución mundial de oncocercosis 2017



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2018. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



(WHO, 2019)

### 4.3.2. América

En América Latina actualmente solo se reportan casos en Brasil, cuyo foco principal es Amazonas-Roraima, y Venezuela, que posee un solo foco activo, el Foco Sur (Onchocerciasis Elimination Program for the Americas (OEPA), 2019; Rodríguez y Lizarazo, 2010).

Los países que han sido certificados para la eliminación de la transmisión de la oncocercosis son, Colombia en 2013, Ecuador en 2014, México en 2015 y Guatemala en 2016. Todos los anteriores cuentan con un protocolo de vigilancia pos-interrupción de transmisión (Carvajal, Saldarriaga,

Escudero, y Restrepo, 2016).

### 4.3.3. Guatemala

Antes de la eliminación de la transmisión, el país tenía el mayor número de personas en riesgo en América. El foco principal era el Foco Central (comprendido por un área que abarca Suchitupéquez, Chimaltenango y Sololá), seguido por el foco Escuintla-Guatemala, Santa Rosa y Huehuetenango. Para eliminar la transmisión, las autoridades utilizaron los lineamientos planteados por la OMS, contemplando dos rondas de tratamiento, al año en las comunidades elegibles. Estas rondas fueron realizadas hasta 2011, cuando se comprobó que la transmisión había sido interrumpida en todos los focos y se interrumpió la medicación masiva con IVM y se inició la vigilancia epidemiológica post-tratamiento. En 2014, se realizó la última evaluación entomológica, con la que no se detectó infección en los vectores (Griswold y cols., 2018; F. Richards y cols., 2015; Sauerbrey, Rakers, y Richards, 2018).

En este punto, el país solicitó a la OMS la certificación de la eliminación, para entonces los criterios utilizados fueron los establecidos en los lineamientos de la OMS publicados en el 2001. Dentro de estos criterios se encontraba que debía de haber una ausencia de infección por *O. volvulus* en el vector, lo cual se determinó a través del PCR O-150 (WHO, 2016). Ante la ausencia de infección en el vector, el Ministerio de Salud preparó el informe de país y solicitó la verificación de la eliminación de la oncocercosis a la OMS. Luego de la visita del equipo de verificación de la OMS en el 2016, Guatemala obtuvo la certificación de la eliminación de la transmisión (Richards y cols., 2015; WHO, 2016).

### 4.3.4. Vectores

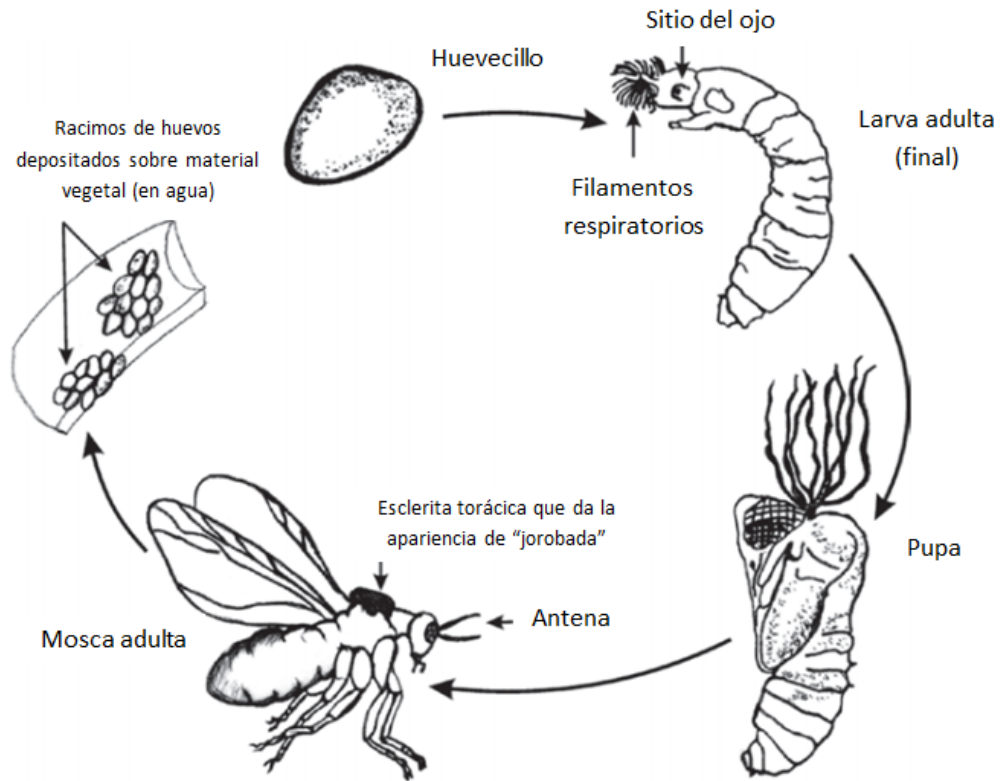
El único vector de la oncocercosis son los simúlidos, pertenecientes al género *Simulium* spp. Existen alrededor de 1, 000 especies identificadas alrededor del mundo, varias de ellas son vectores de la enfermedad para humanos. Estas son pequeñas y como su nombre lo dice la mayoría son de color negro/gris, aunque algunas especies como *S. ochraceum* son color amarillo claro (Shaw y Catteruccia, 2019).

Las hembras pertenecientes a este género son hematófagas. Lo que indica que adquieren los nutrientes necesarios para la maduración de los huevos de sangre de vertebrados. Para la ovoposición la mosca emplea dos métodos de selección: química y visual, lo cual le permite elegir el mejor sitio para depositar los huevos, en superficies húmedas, usualmente rocas. A diferencia de *Anopheles* spp. las hembras buscan ovopositar en estructuras sumergidas agua limpia de ríos con corriente suave (Mantilla, Moncada, Matta, y Adler, 2014). Los machos, por otra parte, basan su dieta en el consumo de azúcares usualmente de jugos provenientes de plantas (Adler y McCreddie, 2019).

Para que el huevo se desarrolle, la larva requiere de un promedio de una semana, dependiendo de la especie de simúlido. A partir de allí, la etapa de pupa puede durar hasta 4 semanas o bien de 8-12 días, como es el caso de la *S. damnosum*, y la mosca adulta puede vivir hasta cuatro semanas. Su ciclo de vida puede observarse en la Figura 4.3.

El *S. ochraceum* era el vector de la enfermedad en los focos de México y Centroamérica. En el foco activo de Venezuela los principales vectores son *S. guianense* y *S. oyapockense*. Mientras que en los países de África Central y del este es el *S. neavei* y *S. damnosum* (Adler, Hamada, Cavalcante do Nascimento, y Grillet, 2017; Botto y cols., 2016).

Figura 4.3: Ciclo de vida de la *Simulium* spp



(Tilgner, 2009)

#### 4.4. Animales reservorios

Oficialmente, el principal reservorio animal de este nematodo es el ser humano. Sin embargo, se ha determinado que animales como los antílopes y búfalos son posibles reservorios. Pero no es patógeno para ninguno de ellos. Y ambos están distribuidos alrededor de África, lo cual dificultará el control de la enfermedad en esta región (Brattig, 2004; Koroma y cols., 2018).

#### 4.5. Tratamiento de la Oncocercosis

##### Ivermectina (IVM)

Es un medicamento derivado de la avermectina, producida por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*. Desde su descubrimiento a finales de 1970s, se ha utilizado como tratamiento contra distintos parásitos. Y desde 1988 se utiliza como el principal tratamiento en contra de *O. volvulus* como microfilaricida (Crump y Omura, 2011).

La IVM actúa a nivel de los canales de cloruro activados por glutamato (GluCl), que solo se encuentran en los invertebrados protostomados. Este es un tipo de canal iónico dependiente de ligando

pentamérico (pLGIC); cada una de estas proteínas se compone de cuatro subunidades denominadas M1-M4. Los GluCl se expresan en las neuronas motoras, faríngeas, cordones nerviosos laterales y bilaterales del nematodo, y se caracterizan por cumplir con un amplio rango de funciones, como la locomoción, alimentación y regulación de los estímulos sensoriales (Atif, Estrada-Mondragon, Nguyen, Lynch, y Keramidas, 2017; Laing, Gillan, y Devaney, 2017).

IVM se une a las subunidades M3 y M1 logrando separar a las proteínas y abriendo el GluCl. El cambio conformacional permite el paso de iones de cloro junto con una potenciación de la respuesta de glutamato, provocando la hiperpolarización de las neuronas y músculos. Esto paraliza al nematodo, evitando que este logre movilizarse y alimentarse. En los gusanos hembra ha demostrado inhibir la producción de MF *in útero*; se cree que esto se debe a la presencia de una subunidad de GluCL, *avr-14*, presente en las células del tracto reproductor (Chen y Kubo, 2018; Wolstenholme, 2012).

El efecto microfilaricida es reversible luego de seis meses, por ello es que el tratamiento debe repetirse hasta que mueran los gusanos adultos. En dado caso que no se hiciera, habría una reemergencia de MF en la piel (Crump y Omura, 2011; Osei-Atweneboana y cols., 2011).

La IVM es un medicamento extremadamente seguro y eficaz para seres humanos por dos aspectos, (1) al ser una molécula grande no es capaz de pasar la barrera del humor sanguíneo al acuoso, lo cual evita un daño a nivel ocular o del sistema nervioso central (SNC). (2) Los vertebrados no expresan los canales GluCl, evitando que la molécula interactúe con las células del hospedero (Laing y cols., 2017). Y ha demostrado ser tan eficaz que su efecto microfilaricida dura meses luego de haber dejado el sistema (E. W. Cupp, Mackenzie, y Unnasch, 2011).

## **Moxidectina**

O también conocido como MOX es una lactona producida por la actinobacteria *Streptomyces cyanogriseus* subespecie *Noncyanogenus*. Tiene un amplio espectro de acción sobre nematodos, insectos y ácaros. Se empezó a utilizar en ganado desde 1989. En la actualidad se encuentra en la fase III de ensayos clínicos para su uso como tratamiento contra *O. volvulus*, en dosis de 3 y 36 mg (Cobb y Boeckh, 2009; Song y cols., 2018).

El mecanismo de acción es el mismo descrito para la IVM (Cobb y Boeckh, 2009)

## **Doxiciclina**

Se utiliza en combinación con IVM. Dicho antibiótico ha demostrado tener un efecto negativo sobre la embriogénesis de *O. volvulus*, debido a que ataca al endosimbionte *Wolbachia* sp (Hoerauf y cols., 2001). La bacteria Gram negativa es heredada de la madre e influye sobre el ciclo reproductivo del hospedero, principalmente a través de partenogénesis. Durante dicho proceso la bacteria infecta a los óvulos haploides, duplicando el material genético materno y haciendo que estos embriones se conviertan en hembras. Estudios han demostrado que las hembras infectadas producen el doble de progenie, a comparación de aquellas que no lo están (Higazi y cols., 2005; Prevot, 2015).

## **Remoción de nódulos subcutáneos**

Cuando los nódulos subcutáneos se inflaman se denominarán oncocercomas, estos se localizan cerca de los ojos o en la cabeza, se opta por la remoción quirúrgica. Cuando la infección es persistente, se opta por un tratamiento de seis semanas con doxiciclina e ivermectina si no ha tenido efecto alguno sobre el nematodo (Debrah y cols., 2015; Keating, Yukich, Mollenkopf, y Tediosi, 2014).

Los oncocercomas, también podrán encontrarse cerca de prominencias óseas, lo cual facilita su

extracción. Este método también es utilizado como una herramienta para mapear la distribución de la enfermedad (Vlaminck, Fischer, y Weil, 2015).

## 4.6. Diagnóstico

### Diagnóstico parasitológico

El método de diagnóstico parasitológico estándar para la oncocercosis es la detección de MF en piel por microscopía. Este consiste en obtener biopsias de piel del paciente, utilizando un esclerocorneótomo o, en su defecto, una punta de aguja. Comúnmente, la biopsia se obtiene de los hombros o de las crestas ilíacas y es de 1 mm de diámetro. La biopsia se coloca en un medio salino, para liberar las MF del tejido y poder evaluarlas mediante microscopía. Además, se debe secar y pesar la muestra de piel, ya que los resultados se reportan como el número de MF por miligramo de piel (Enk, 2006; Thiele y cols., 2016).

Este método de diagnóstico se ha vuelto poco popular, pues para poder visualizar las MF se necesita que el gusano adulto tenga al menos 1.5 años para haber liberado las suficientes MF como para ser detectadas por microscopía (Enk, 2006; Udall, 2007).

### Diagnóstico inmunológico

Las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la oncocercosis están diseñadas para detectar la presencia de anticuerpos contra OV16; esta es una proteína recombinante de unión a fosfatidil-tanolamina la cual recibe su nombre debido a que consta de 16 aminoácidos; se caracteriza por ser altamente inmunogénica, estar presente durante todo el ciclo de vida del nematodo y ser específica al mismo (Lobos y cols., 1991; Richards y cols., 2018).

Este antígeno es catalogado como un 'indicador sensible' ya que el nematodo lo comienza a expresar desde sus primeros estadios, desencadenando una respuesta de anticuerpos antes de la aparición de las MF. OV16 también se caracteriza por ser expresado durante infecciones patentes, es decir que no se desarrollan con éxito a causa de que las MF eran del mismo género y por ende no hubo reproducción (Richards y cols., 2018). Actualmente existen otros antígenos diseñados para la detección de *O. volvulus* (ej. OV103 y OV10) sin embargo, ninguno de estos muestra la especificidad y sensibilidad que OV16 (Unnasch, Golden, Cama, y Cantey, 2018). Es por ello que es considerado como el antígeno estándar para la detección de la oncocercosis.

Otra proteína utilizada para el diagnóstico de oncocercosis es la oncocistatina o OV17, esta proteína es expresada en la hipodermis del nematodo y diferentes estadios (adulto, MF adulta y L3). Su continua expresión mantendrá activa la respuesta inmune específica para OV17, y por ende permite la formación de anticuerpos detectables a través de métodos moleculares. Por otra parte, OV33 es un antígeno localizado en los músculos y aparato reproductor del nematodo adulto y L3, es altamente inmunogénico. Al igual que OV17 esto permitirá la presencia de grandes concentraciones de anticuerpos específicos en la muestra del paciente, detectables por métodos moleculares o inmunológicos (Bradley y cols., 1993; Lucius y cols., 1988). Clínicamente esto representa una ventaja, ya que permitiría la detección de individuos con cargas filariales bajas o aquellos con anticuerpos anti-L3 (Rodríguez-Pérez y cols., 2003).

## ELISA

Su nombre proviene de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Esta técnica de inmunoensayo, consiste en la detección de un ligando a través de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo. Estos complejos son detectados a través de una señal fluorescente, que resulta de la unión de una enzima y un sustrato específicos. Esta señal se interpreta como positiva para el ligando que se busca (Aydin, 2015). En oncocercosis el ELISA más utilizado está diseñado para la detección de anticuerpos IgG4 anti-OV16, y muestra una especificidad y sensibilidad alta de 99.7% y 88.2%, respectivamente. Se utilizan alrededor de 1.0-0.5 µg del antígeno por pozo con muestras de sangre eluída de papel filtro o con suero del paciente. Cuando se tiene un paciente con biopsia de piel negativa y ELISA positivo, este deberá confirmarse a través de PCR O-150 (Cama y cols., 2018; Unnasch y cols., 2018).

El ELISA con OV16 es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico por sus múltiples ventajas. Entre ellas se encuentran su rapidez, el resultado no se ve afectado si el paciente ha empezado su tratamiento con IVM, tiene una alta sensibilidad y especificidad. A comparación de la microscopía de biopsias de piel, la toma de muestra para el ELISA es menos invasiva, lo cual se traduce en una mayor aceptación por parte de los pacientes. Y en cuestiones de costos, llevar a cabo un ELISA cuesta alrededor de US \$0.15 por muestra, mientras que la biopsia de piel cuesta US \$7.58. La única desventaja del ELISA es que no indica si la infección es actual o pasada (Dieye y cols., 2017; Lobos y cols., 1991; Vlamincx y cols., 2015; World Health Organization (WHO), 2016).

## Sistema de Inmunoprecipitación Luciferasa (LIPS)

La base del inmunoensayo es trabajar con antígenos, marcados con luciferasa, producidos en células eucariotas. Para ello se utiliza un vector de expresión de mamíferos, como pREN2, el cual constará del gen Ruc y el gen que codifique para el antígeno de interés. El vector se introduce a células Cos1, mediante transfección, y se incuba durante 48 horas para luego tratarse con una solución de lisis celular (Burbelo, Lebovitz, y Notkins, 2015).

Para *O. volvulus* los antígenos utilizados son OV-FAR-1, OV-API-1, OV-MSA-1 y OV-CPI-1. Según un estudio realizado por Burbelo Burbelo, Leahy, Iadarola, y Nutman (2009) este método no solo tiene una sensibilidad de 100%, sin perder la especificidad, sino que también puede utilizarse como un método de mapeo para identificar nuevas áreas de transmisión.

### 4.6.1. Métodos moleculares

Se utiliza variantes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), principalmente tiempo real y anidado. En ambos casos se necesita un mínimo de 200 µl de muestra, que es menor cantidad a los 2 mg de piel necesarios para una prueba parasitológica de presencia de MF. Para ambas se necesita una menor cantidad de muestra de piel, sangre o ambos, comparado con las mencionadas anteriormente (Tang y cols., 2010).

Uno de los PCR más utilizados es el O-150 que se basa en la amplificación de una secuencia repetitiva de 150 nucleótidos, ubicada en la región denominada O-150. Si bien esta técnica proporciona un diagnóstico rápido y certero, este es el método de diagnóstico más caro. Por lo que en muchos de los países endémicos no se utiliza como primera opción (Fink, Fahle, Fischer, Fedorko, y Nutman, 2011; Meredith, Lando, Gbakima, Zimmerman, y Unnasch, 1991; Meredith, Unnasch, Karam, Piessens, y Wirth, 1989).

## Ensayo de perlas múltiplex (MBA, por sus siglas en inglés)

El MBA es una técnica que permite evaluar hasta 100 analitos de manera simultánea, utilizando un solo volumen de muestra. Es capaz de detectar desde citoquinas solubles, antígenos, anticuerpos hasta quimioquinas; para ello el sistema utiliza microesferas (o perlas), citometría de flujo y fluorescencia. Las microesferas cuentan con dos fluorocromos internos (rojo e infrarrojo) combinados en diferentes concentraciones, obteniendo alrededor de 100 diferentes sets de microesferas cada una con una firma espectral única. Esto permite asignarle a cada perla un analito en particular, véase Figura 4.4.

Figura 4.4: Combinación de tintes en las microesferas

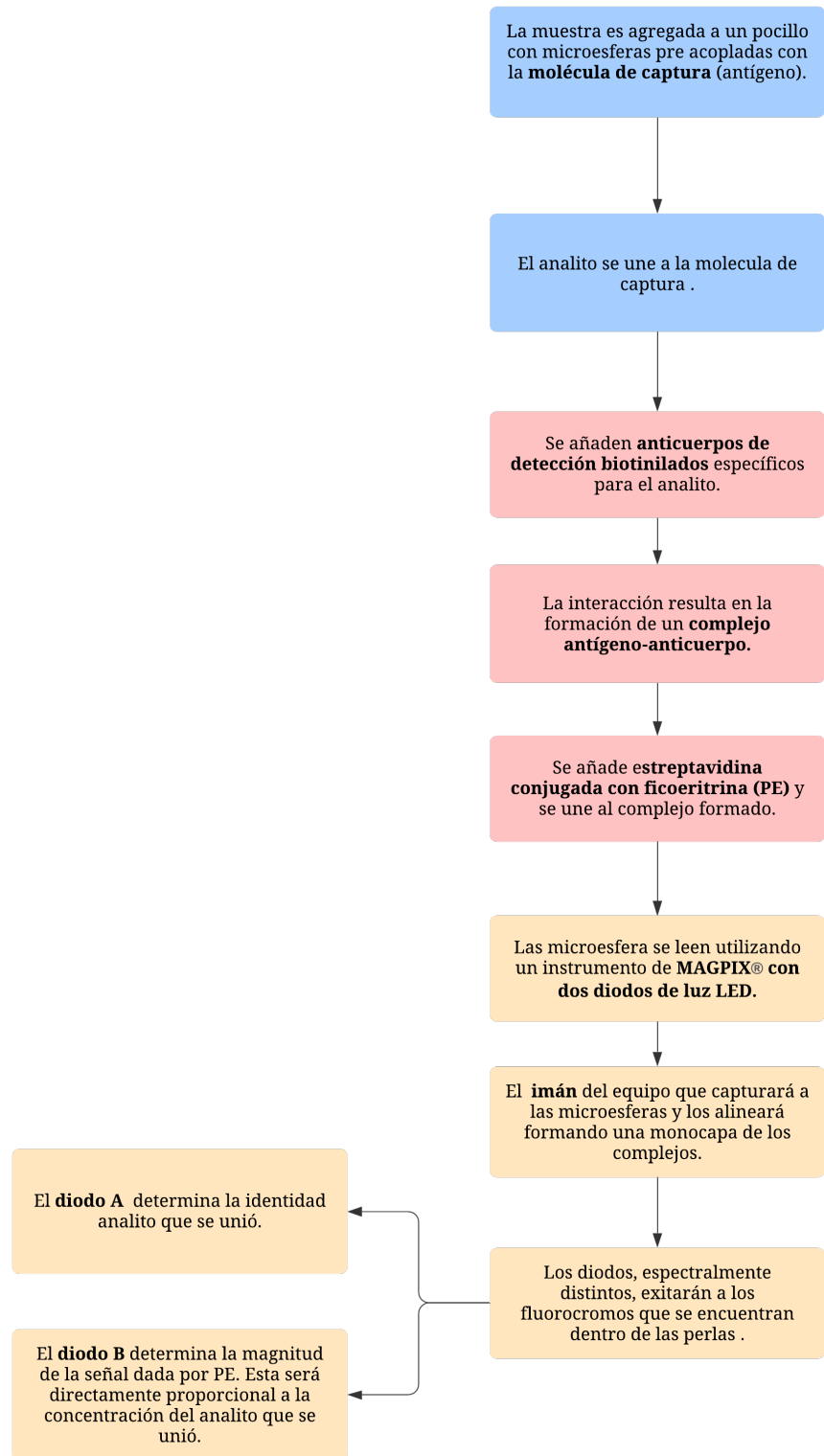


(Houser, 2012)

También se caracterizan por estar recubiertas por grupos carboxilo, que sirven como sitios de unión para las moléculas que capturarán a los analitos. La unión entre ambos componentes, permite que una molécula reportera se sume al complejo creado (Khan, Smith, Reda, Suffredini, y McCoy Jr., 2004; Luminex® , 2018).

Para la detección, véase Figura 4.5, el equipo cuenta con dos diodos emisores de luz (LED por sus siglas en inglés) . La mezcla de fluorocromos será excitada por el diodo A o láser rojo, la señal emitida permite identificar a que región pertenece la perla y por ende la identidad del analito. Mientras que el diodo B o láser verde excita la molécula reportera asociada con la microesfera, la señal emitida permite conocer la concentración del analito unido. Ambas señales son detectadas y el análisis de estas dirá qué analitos estuvieron presentes durante el ensayo, dando paso a un diagnóstico (Luminex® , 2018).

Figura 4.5: Funcionamiento general del Ensayo Múltiplex de Perlas



(Luminex®), 2018)

El MBA es una alternativa útil para el monitoreo y detección de ETDs. Permitiendo la evaluación rápida de aquellas enfermedades latentes, junto con el inicio del tratamiento. Esta herramienta podría utilizarse para enfocar la administración masiva de medicamento (AMM) a las zonas vulnerables. La AMM es la estrategia de actual de la OMS para la eliminación de oncocercosis en los mayores focos. También puede utilizarse como una herramienta para la detección y cuantificación de biomarcadores, por ejemplo aquellos que se encuentran ligados a la respuesta inflamatoria (Breen y cols., 2016; Feeser y cols., 2017).

#### **4.6.2. Control de calidad (CC)**

CC serán el conjunto de prácticas, procedimientos y recursos que permitan detectar, minimizar y corregir deficiencias para asegurar la calidad y validez de los datos obtenidos durante un proceso de análisis. Para ensayos inmunológicos estas son paneles con muestras de referencias, ensayos de reproducibilidad, etc. El CC reducirá el riesgo de proporcionar un resultado inexacto, de baja confiabilidad y precisión para el paciente o para la investigación en curso; por lo general se recomienda que cada una de las pruebas posea una documentación en la cual se describan los pasos a llevar a cabo para realizar este CC. Esto con el objetivo de estandarizar el procedimiento y así cumplir con los objetivos del CC (Centers for Disease Control and Prevention, 2018; World Health Organization (WHO), 2009).

Un documento que asegura la calidad del procedimiento es el Procedimiento Normado de Operación (SOP, por sus siglas en inglés), en este se detalla paso a paso las instrucciones de una rutina o procedimiento complejo. Para su elaboración cada laboratorio se encarga de fijar el formato y lineamientos específicos, por eso variará entre laboratorios. Por ejemplo el CES de la Universidad del Valle de Guatemala utiliza los lineamientos dados por el programa especial de investigación y formación en enfermedades tropicales (TDR) (World Health Organization (WHO), 2009).

Durante una prueba diagnóstica se ven involucrados varios procesos, descritos en diferentes SOPs y una manera sencilla de observarlos es a través de un diagrama de flujo panorámico. Esta es una herramienta que facilita la visualización del proceso diagnóstico, pues se describen los pasos claves desde el inicio hasta el final del procedimiento (Wilson y Rigakos, 2016).

#### **4.6.3. Análisis estadístico**

Una manera convencional para describir la precisión de un instrumento diagnóstico es a través del análisis estadístico de los datos obtenidos.

#### **Curva de característica operativa del receptor (ROC, por sus siglas en inglés)**

ROC es una herramienta de la epidemiología clínica que permite cuantificar que tan precisa es una prueba o sistema de diagnóstico para discriminar entre dos estados de pacientes, estos siendo “enfermo” y “no enfermo”. Esta viene siendo la representación gráfica de la relación inversamente proporcional que existe entre la sensibilidad y especificidad de una prueba. Una parte importante de ROC es la línea de oportunidad, que consiste en una línea diagonal que se extiende de la esquina inferior izquierda hacia la esquina superior derecha. Esta representa los puntos en donde la sensibilidad y especificidad se igualan, por lo que una curva cercana a esta reflejaría que la prueba o sistema es poco preciso (Hajian-Tilaki, 2013; van Erkel y Pattynama, 1998).

## Distribución de datos

Existen diferentes gráficos y estadísticos que permiten determinar el tipo de distribución que un set de datos posee, por ejemplo gráfico Q-Q y diagramas de caja y bigotes. El gráfico Q-Q permite determinar el tipo de distribución de los datos de MFI y la simetría y curtosis de dicha distribución. Si los puntos trazados en el gráfico se encuentran formando una línea recta, puede decirse que la distribución es normal. Si el extremo inferior de la gráfica Q-Q se desvía de la línea recta pero el extremo superior no, entonces la distribución está sesgada hacia la izquierda (negativamente) pero si el extremo superior del gráfico Q-Q se desvía de la línea recta pero el inferior no, entonces la distribución está sesgada a la derecha (o sesgada positivamente). En cuanto a la curtosis, si ambos extremos de la gráfica Q-Q se desvían de la línea recta y su centro es recto, tenemos una distribución con una cola gruesa. Una distribución de cola delgada formará una gráfica Q-Q con una desviación muy pequeña o insignificante en los extremos (Wang, Steele, y Zhang, 2016).

El diagrama de caja y bigote da una idea del nivel de acuerdo entre los datos. La mediana es la que se muestra en el centro del cuadro. El rango indica la distribución de los datos; la distancia entre el valor más pequeño y el valor más grande, incluidos los valores atípicos. Los bigotes superiores e inferiores representan puntos fuera del 50% de la muestra. Los bigotes generalmente se extienden sobre un rango más amplio que los grupos del cuartil medio (Williamson y Kendrick, 1989).

### 4.6.4. Parámetros de validación

La validez de una prueba está dada por la sensibilidad y especificidad del instrumento. La sensibilidad es la capacidad de la herramienta de clasificar correctamente a un paciente como “enfermo”, mientras que la especificidad su capacidad de clasificar a los “no enfermos”. A raíz de estos surgen otros parámetros como el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo, este último determina cuántos de los negativos son realmente negativos y viceversa para el valor predictivo positivo (Parikh, Mathai, Parikh, Chandra Sekhar, y Thomas, 2008).

## 4.7. Vigilancia epidemiológica post eliminación de la oncocercosis

### 4.7.1. Lineamientos de la OMS

Según las recomendaciones de la OMS (2016) la vigilancia post-eliminación de la oncocercosis se centra en la evaluación entomológica del vector para demostrar la ausencia de L3 de *O. volvulus*, esto mediante el PCR O-150, utilizando sondas específicas de ADN para el nematodo. Las evaluaciones deberán de realizarse de manera regular hasta que la eliminación sea verificada en todos los países de la región, que en el caso de Guatemala sería América.

Existe la posibilidad que en un futuro estos lineamientos cambien debido al surgimiento de nuevas metodologías, como pruebas diagnósticas. Si ese fuera el caso, estas deberán ser aprobadas y validadas en campo. Su implementación sería recomendada en versiones futuras de los lineamientos de la OMS.

## 4.7.2. Protocolos establecidos en países latinoamericanos

### Guatemala

Guatemala cuenta con su propio protocolo de vigilancia epidemiológica post-eliminación, en el cual se detallan las acciones inmediatas a tomar luego de la identificación de un caso sospechoso, junto con las acciones de control y los indicadores de vigilancia (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social [MSPAS], 2018).

El protocolo consta de dos instancias (1) el monitoreo permanente de síntomas y signos de la enfermedad en la población, a través de una vigilancia pasiva en la cual se busca identificar casos sospechosos. Estos se definen como el individuo que posea nódulos fibrosos irregulares en el tejido subcutáneo, cuerpo extraño intraocular con movimiento propio y/o síntomas cutáneos (oncodermatitis papular); tanto en la población general, como en aquellas personas procedentes de cualquier parte del mundo donde la transmisión aún esté activa (MSPAS, 2018).

Según los lineamientos establecidos por la MSPAS (2018), cualquier caso sospechoso será remitido a los centros de salud y deberá realizarse las pruebas de diagnóstico establecidas, siendo estas la nodulectomía para extirpación del nódulo subcutáneo (onchocercoma) en busca de *O. volvulus* adultos. Prueba serológica mediante un ELISA OV16, con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos IgG4 y una biopsia de piel que dé positivo para la identificación de MF. De ser un caso positivo deberá de ser comunicado dentro de las primeras 24 horas, luego de ser identificado, en el Epidemiario y registrarse en el Sistema de Información General de Salud 3 (SIGSA 3).

(2) Evaluaciones entomológicas de *Simulium* spp., provenientes de los antiguos focos, en busca del nematodo en su estadio L3. Estas serán realizadas periódicamente y coordinadas por la Sección de Entomología del Programa de Enfermedades Transmitidas por Vectores (MSPAS, 2018).

### Colombia

El protocolo colombiano, propuesto por el instituto nacional de salud -INS- (2014), define como objetivo principal la identificación oportuna de posibles casos nuevos en las áreas de riesgo. Para confirmar un caso positivo, a diferencia de Guatemala, el INS pide las pruebas ya descritas junto con un diagnóstico dado por un oftalmólogo calificado, quien confirme la presencia de MF en la cámara anterior del ojo. 1.1220

## 5.1. Procedimiento

### 5.1.1. Elaboración de procedimientos normados de operación (PNO)

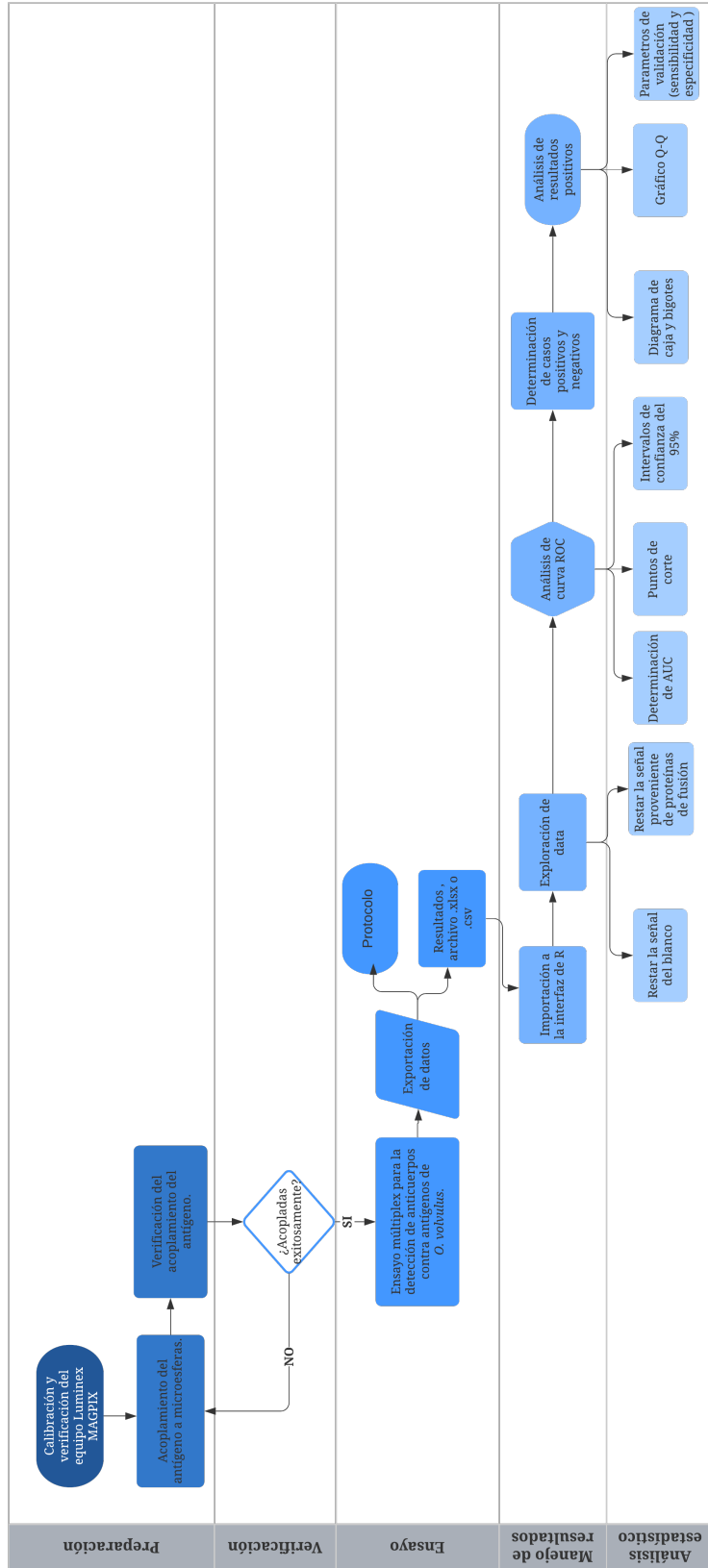
Se desarrollaron protocolos tanto para los procedimientos claves de la detección de anticuerpos IgG4 anti-OV16 usando el equipo Luminex® MAGPIX®, como para aquellos asociados al análisis de la respuesta de anticuerpos. Esto con el objetivo de que en un futuro sean utilizados para la estandarización y validación del método en el país.

El formato utilizado para elaborar los PNOs es el que se utiliza en el laboratorio de Leishmaniasis y Oncocercosis del CES, siguiendo los lineamientos y formatos de las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico, recomendados por el TDR de la Organización Mundial de la Salud. La secuencia lógica para su uso se encuentra representada en la Figura 5.1.

### 5.1.2. Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®

Antes de una corrida es necesario calibrar el equipo para configurar el sistema y asegurar que las microesferas se clasifiquen de manera óptima y consistente durante la corrida. Por otro lado, la verificación confirmará que el analizador esté funcionando de manera correcta (Luminex® Corporation, 2011). Ambos procesos comprenden el primer SOP elaborado; en este documento se detallan los reactivos y comandos a seguir antes de iniciar con los análisis diagnósticos (Luminex®, 2011).

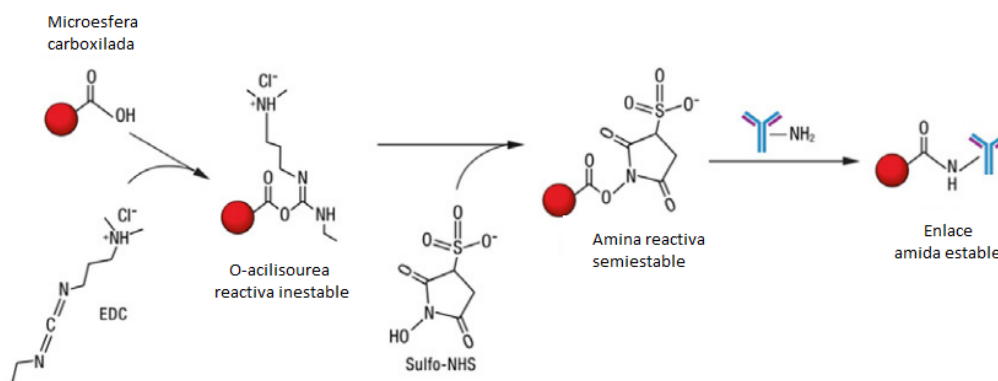
Figura 5.1: Flujo de trabajo para llevar a cabo un inmunoensayo usando el equipo Luminex® MAGPIX®



### 5.1.3. Acoplamiento del antígeno a las microesferas

Para cualquier tipo de detección a través del MAGPIX® se debe de acoplar la molécula de captura a las microesferas xMAP®, el principio de esto es una reacción de carbodiimida de dos pasos, como se muestra en la Figura 5.2, en la cual los grupos carboxilos que recubren la microesfera son activados por medio de derivado de carbodiimida para formar al intermediario O-acilisourea. Al ser un éster inestable es tratado con N-hidroxisuccinimida. Esta activación permite que los carboxilos interactúen con las aminas primarias de la molécula para formar un enlace covalente (Luminex®, 2011).

Figura 5.2: Reacción de carbodiimida



(Luminex® Corporation, 2011)

En el caso de la detección de *O. volvulus* la molécula de captura son los antígenos OV16, OV17 y OV33, que se acoplarán a la superficie de las microesferas de manera covalente. Este es el segundo SOP que se elaboró siguiendo las indicaciones del fabricante (Cox y cols., 2019; Luminex®, 2018).

### 5.1.4. Verificación del acoplamiento del antígeno

Verificar el acoplamiento del antígeno es necesario para asegurar que el mismo se hizo de manera adecuada y las que las microesferas están aptas para realizar el inmunoensayo. Además, a partir de esta etapa se puede determinar la confiabilidad y calidad que tendrán los ensayos a desarrollar. Durante este proceso las microesferas acopladas reaccionan con un anticuerpo de detección anti-antígeno (marcado con ficoeritrina) y la fluorescencia emitida por el complejo, se mide con el equipo MAGPIX®. La intensidad de fluorescencia media (MFI) obtenida será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos acoplados en la superficie de la esfera (Luminex®, 2011, 2018)

### 5.1.5. Inmunoensayo múltiplex para la detección de *O. volvulus* con microesferas acopladas con antígenos recombinantes

Los inmunoensayos múltiplex son utilizados para la detección sustancias biológicas a través de citometría de flujo y microesferas xMAP® recubiertas con antígenos de captura específicos para un anticuerpo. Es un proceso específico, rápido y de alto rendimiento cuyos parámetros variarán de acuerdo al tipo de muestra y antígeno a evaluar. Por ello se elaboró un SOP específico para la

detección de anticuerpos IgG e IgG4 anti-OV16, OV17 y OV33 presentes en el suero (Feeser y cols., 2017; Lobos y cols., 1991; Luminex®<sup>®</sup>, 2018).

### 5.1.6. Análisis e interpretación de resultados

Los resultados obtenidos de cada corrida son administrados por el software Bio-Plex®<sup>®</sup>, el cual se encarga de registrar la MFI y la concentración estimada del analito. El conjunto será denominado como los datos en bruto. El análisis e interpretación de estos posee distintos componentes, entre los cuales podemos encontrar la exportación de los datos a formato más accesible para el usuario, exclusión de datos atípicos, ajuste de la curva de calibración, visualización de los resultados y análisis estadístico.

Sistematizar los pasos para cada uno de estos componentes permite que el análisis e interpretación de los resultados sea un proceso más amigable para el usuario, por lo que se desarrolló un protocolo con base a estudios previos (Breen, 2017; Breen y cols., 2016; Eckels y cols., 2013; Sanz y cols., 2017; Won, Goldberger, Shen-Orr, Davis, y Olshen, 2012).

Para el análisis, se desarrolló un pipeline con base en diferentes paquetes del lenguaje de programación RStudio 1.3.1073 (R Core Team, 2020) ya que, a diferencia de otros lenguajes, este posee un enfoque estadístico. El código incluye las siguientes funciones de manera secuencial:

1. *read\_excel/read.csv* estas funciones se utilizaron para importar los datos crudos a la interfaz de R, en un formato csv o xlsx.
2. *prediction* se utilizó para transformar la base de datos a un formato estandarizado, dentro de este se colocaron las variables que se deseaban tener en la ROC.
3. *performance* se encargó de realizar múltiples evaluaciones predictivas, para calcular la curva ROC se utilizaron los argumentos *tpr* (*true positive rate*) y *fpr* (*false positive rate*). Se utilizó la misma función con el argumento *auc* para obtener el AUC de la curva ROC.
4. *plot* devolvió el tipo de gráfico ROC construido con las funciones descritas anteriormente.
5. *coords* con los argumentos *best* y *threshold* se encargó de determinar los puntos de corte para el modelo.
6. *ci\_coords* con esta función se calculó el intervalo de confianza de los datos; dentro del comando se especificó que fueran del 95% pues es lo recomendado por el fabricante del equipo.
7. *filter* se colocó para filtrar la base de datos original en función al punto de corte. De esta manera se obtuvo un subconjunto de datos con solo las mediciones por arriba de este valor.
8. *qqnorm* en una función que generó el gráfico Q-Q (cuantil-cuantil) con el que se determinó si los datos tenían una distribución normal o no, y *qqline* añadió una línea teórica en los cuantiles primero y tercero.
9. *boxplot* devolvió el diagrama de caja y bigote para observar la dispersión de los datos analizados para cada sistema antígeno anticuerpo.
10. *epitests* calculó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (negativos y positivos) de la prueba diagnóstica. También devolvió los intervalos de confianza (del 95%) de cada parámetro descrito.

Como parte de estos protocolos se elaboró un flujograma, véase Figura 4.5, indicando los métodos de procesamiento de la muestra, corrida, extracción, limpieza y análisis de resultados, con el fin de facilitar el proceso.

### 5.1.7. Validación de pipeline de análisis y flujograma

Para validar el pipeline de R se trabajó con la base de datos Feeser y colaboradores (2017) obtenida con un equipo Bio-Plex® 200 (Bio-Rad® Laboratories). Esta posee 610 lecturas de respuesta de anticuerpos IgG e IgG4 a los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de *Onchocerca volvulus*, provenientes de pacientes con oncocercosis y otras filarias de áreas endémicas para dichas enfermedades. Siendo estas oncocercosis, filiaris linfática, cisticercosis, estrongiloidiasis y esquistosomiasis. La base de datos se obtuvo ya revisada y sin discrepancias, y la señal de fondo ya había sido restada del MFI reportado.

Se corrió el código elaborado con estos datos, y se desplegaron todos los estadísticos. Paralelo a ello el código se sometió a pruebas de estrés, esto con el objetivo de documentar si era capaz de detectar valores fuera de los rangos biológicos esperados y cualquiera otra limitación de su capacidad. De acuerdo con los resultados de estas pruebas, se realizaron los ajustes al pipeline hasta que su desempeño fuera satisfactorio.

### 5.1.8. Aspectos éticos

Los datos utilizados para la validación del pipeline se obtuvieron del custodio, desligados de identificadores personales, por lo que no es posible vincularlos con personas individuales. Además, no se utilizaron para responder a una pregunta de investigación, sino que para estandarizar una técnica de laboratorio y el análisis de los datos respectivos. Por lo tanto, la actividad está exenta de revisión por parte de un comité de ética en investigación con personas.

## 6.1. PNO

Se elaboraron un total de seis PNO siguiendo los lineamientos de TDR, en ellos se detallan los pasos a seguir para montar el inmunoensayo para la detección de los anticuerpos IgG e IgG4 de *O. volvulus*. Los nombres y su ubicación se encuentran detallados en el Tabla 6.1.

Tabla 6.1: Título de PNO y ubicación

PNO	Anexo
Inicio y apagado del equipo Luminex® MAGPIX®	1
Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®	2
Acoplamiento de antígeno OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®	3
Verificación del acoplamiento de antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®	4
Ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i>	5
Análisis e interpretación de resultados del ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i>	6

## 6.2. Análisis de curva ROC

El pipeline elaborado en R generó curvas ROC para la respuesta de anticuerpos IgG e IgG4 con los antígenos OV16, OV17 y OV33 y en cada una de este se desplegó el AUC, como se puede visualizar en la Figura 6.1 y los anexos B.1 - B.5. Derivado de estas curvas se lograron obtener los puntos de corte para cada uno de los ensayos. En el caso del antígeno OV16 el AUC del ensayo con IgG fue de 0.985 y para IgG4 de 0.983, los puntos de corte fueron 556 MFI y 40.7 MFI, respectivamente. Para el antígeno OV17 el AUC de IgG fue de 0.907 y para IgG4 de 0.873, los puntos de corte determinados

por el pipeline fueron 766 MFI y 453 MFI como se observa en el Tabla 6.2. En el caso de OV33 el AUC de IgG fue de 0.984 y de IgG4 0.993, este último siendo el más cercano a uno (véase Tabla 6.2); el punto de corte de IgG4 estuvo en 66.0 MFI y en 5,181 MFI.

Figura 6.1: Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anticuerpos IgG4 con microesferas acopladas con OV16

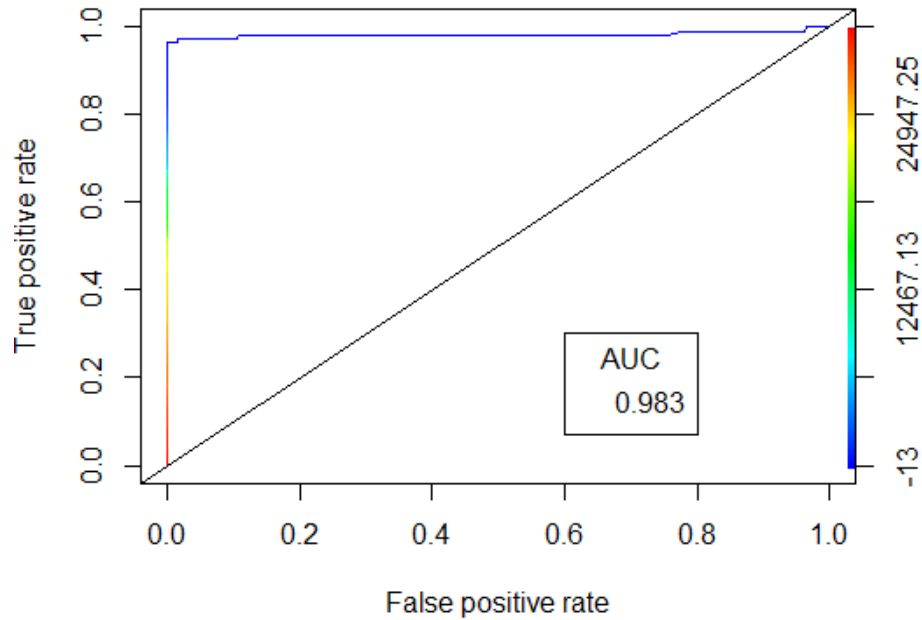


Tabla 6.2: Características de los ensayos de anticuerpos contra los antígenos recombinantes de *O. volvulus*

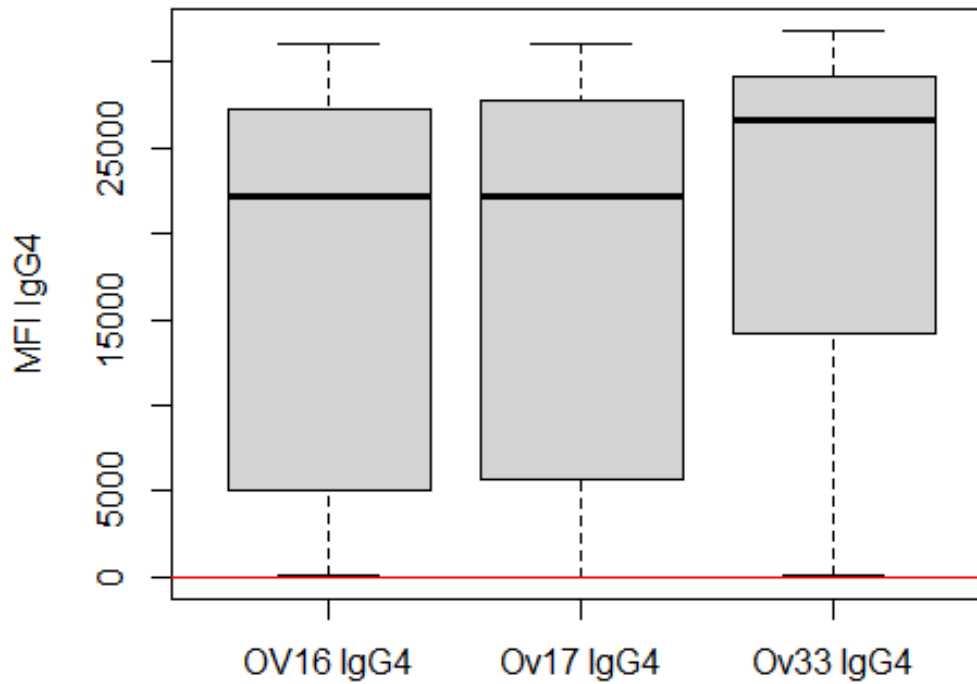
Antígeno	Inmunoglobulina	Punto de corte (95 % CI)	AUC
OV16	IgG	556	0.985
	IgG4	40.7	0.983
OV17	IgG	766	0.907
	IgG4	453	0.873
OV33	IgG	5, 181	0.984
	IgG4	66.0	0.993

### 6.3. Distribución de los datos

El gráfico de caja y bigote permite explorar y analizar de una manera visual la dispersión de los datos dentro de un grupo, permitiendo obtener información sobre posibles datos atípicos importantes para el estudio. En este caso se generó uno para cada ensayo antígeno-anticuerpo, utilizando los valores por encima del punto de corte. Todos los diagramas carecieron de datos atípicos, como se muestra en la Figura 6.2, de igual manera los tres antígenos presentaron una mayor dispersión de los datos comprendidos en el segundo cuartil. Según lo observado en la Figura 6.2, la mediana de

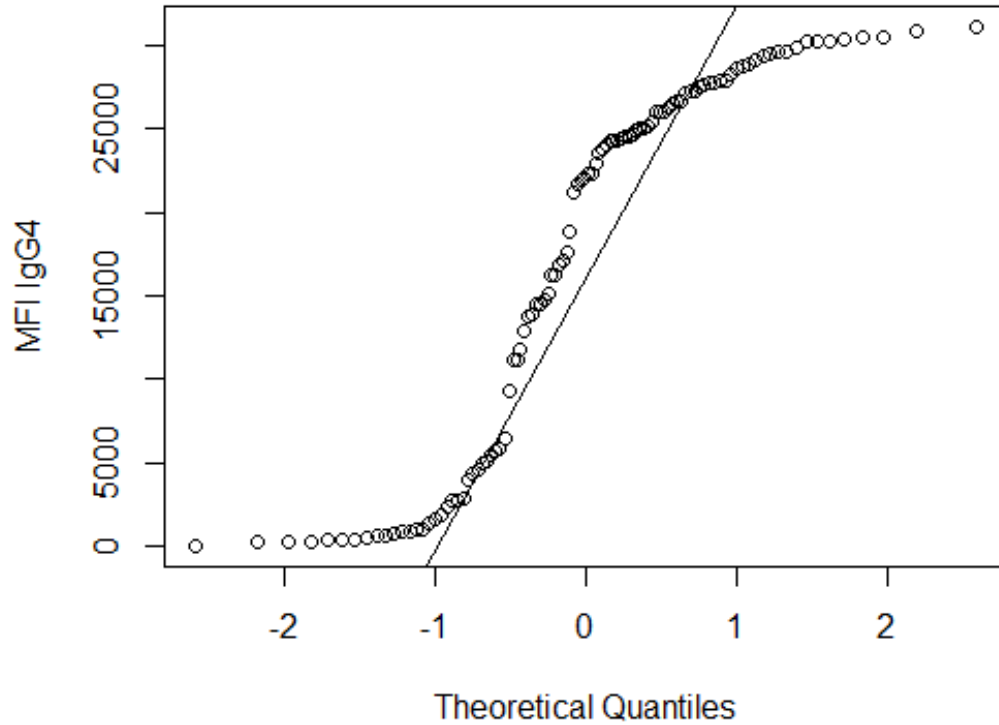
los datos MFI de OV33 es superior a la de OV16 y OV17, esto se corroboró calculando la mediana aritmética a través del comando `mediana()` en R teniendo 22,173 para OV16, 22,204 para OV17 y 26,629 para OV33 . Se utilizó la mediana como medida de tendencia central, ya que esta no se ve afectada por los valores atípicos encontrados en la base de datos. Lo cual le permite representar de mejor manera la distribución de los mismos (CDC, 2017).

Figura 6.2: Diagramas de caja y bigote de la distribución de las repuestas de anticuerpos para los tres antígenos de *O. volvulus*



Con un gráfico Q-Q se espera poder determinar el tipo de distribución de los datos; para una distribución normal se esperaría observar que los puntos trazados estuvieran cercanos a la línea recta. Como se muestra en la Figura 6.3, la tendencia de la respuesta de anticuerpos IgG4 al antígeno OV17 es más cercana a una línea recta, en comparación con la respuesta de anticuerpos IgG4 contra OV16 y OV33 (véase anexos B.6 y B.7).

Figura 6.3: Gráfico Q-Q de la respuesta de anticuerpos IgG4 al antígeno OV16



## 6.4. Parámetros de validación

A partir del punto de corte se generó un comando en el pipeline de R para filtrar los datos de dicho antígeno y así obtener los verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos. Con estos valores se realizaron los cálculos necesarios para obtener los parámetros de validación de cada ensayo antígeno-anticuerpo. Utilizando el punto de corte ya descrito para el ensayo de IgG4 OV16, este clasificó erróneamente a cuatro muestras como negativas, dando como resultado una sensibilidad de 0.96 y un valor predictivo negativo de 0.99; en cambio, la determinación de IgG con OV16 tuvo una sensibilidad de 0.89 como se muestra en el Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Parámetros de validación de cada ensayo múltiplex de antígeno-anticuerpo

Parámetro	OV16		OV17		OV33	
	IgG	IgG4	IgG	IgG4	IgG	IgG4
Sensibilidad	0.89	0.96	0.85	0.77	0.85	0.96
Especificidad	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Valor predictivo de una prueba positiva	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Valor predictivo de una prueba negativa	0.98	0.99	0.97	0.95	0.97	0.99

El OV17 IgG clasificó de manera errónea a 16 muestras como negativas, la sensibilidad del instrumento fue de 0.85. Por otra parte, el OV17 IgG4 clasificó erróneamente a 25 muestras como

negativas y teniendo una sensibilidad de 0.77 (véase Tabla 6.3). El valor predictivo negativo de las inmunoglobulinas fue de 0.97 y 0.95.

Basados en punto de corte de OV33 IgG este clasificó de manera errónea a 10 muestras como negativas e IgG4 lo hizo con 4 muestras, dando sensibilidades de 0.85 y 0.96 respectivamente; el valor predictivo negativo fue de 0.97 y 0.99. La especificidad, véase Tabla 6.3, se mantuvo igual para los cuatro antígenos al igual que la prevalencia y el valor predictivo positivo. Al comparar los valores obtenidos con el pipeline y los reportados en el estudio de Feeser y colaboradores (2017) encontramos una variación de 0.67%-24.8% para los puntos de corte y valores <1% para el AUC, tal y como se observa en el Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Comparación valores reportados y valores teóricos de cada ensayo múltiplex de antígeno-anticuerpo

Parámetro	Porcentaje de variación					
	OV16		OV17		OV33	
	IgG	IgG4	IgG	IgG4	IgG	IgG4
Punto de corte	5.11	23.3	16.2	24.8	0.67	1.49
AUC	0.20	0.10	0.55	0.68	0.00	0.20

En este estudio se desarrolló un protocolo para la detección y análisis de anticuerpos IgG e IgG4 específicos para los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 de *O. volvulus* por ensayo múltiplex. Se elaboraron PNOs para que en un futuro se proceda a la implementación de este ensayo múltiplex como herramienta de vigilancia epidemiológica post-eliminación de la oncocercosis en Guatemala. Esto para cumplir con las recomendaciones de la OMS para los países que ya obtuvieron la certificación de la eliminación de la transmisión de la enfermedad, específicamente la de continuar con el desarrollo de pruebas que permitan una mayor sensibilidad y especificidad, capaces de detectar infecciones en contextos de baja transmisión (WHO, 2020). Además, su implementación sentaría las bases para el desarrollo de una plataforma capaz de detectar múltiples analitos de ETDs endémicas de la región, lo cual cumpliría con una de las metas finales propuestas por LA OMS (2020) para el monitoreo y eliminación de estas enfermedades. El apoyo a la vigilancia mediante estas herramientas debería ser importante para el país, debido al riesgo de una posible reemergencia o reintroducción de la enfermedad por los migrantes que transitan por Guatemala, provenientes de países donde la oncocercosis aún es endémica (Herrera, 2013).

El software de análisis Bio-Plex® de MAGPIX® limita el análisis y exploración de los resultados obtenidos en un ensayo múltiplex. Esto se observa de varias maneras durante el pre-procesamiento de datos, donde se corre el riesgo de que algunas muestras no sean cuantificadas debido a que se encuentran fuera de los rangos de cuantificación del equipo y que carece de la generación de gráficos y valores estadísticos (como AUC, límites de confianza, ANOVA, t-student, diagrama de caja y bigote, regresión lineal, etc.) (Chiu y Christopoulos, 2012; Sanz y cols., 2017). Esta limitante se resolvió utilizando el lenguaje de R como herramienta de análisis, ya que su interfaz permite el manejo de los datos que se obtienen del equipo múltiplex de una manera amigable y flexible para el usuario, generando estadísticos y gráficos de alto nivel. Esto se verificó calculando el punto de corte, y generando gráficos de dispersión y distribución de MFI para cada antígeno evaluado.

La verificación del funcionamiento del pipeline desarrollado se realizó con una base de datos con 610 resultados de pacientes con ETDs de varios países endémicos (Feeser y cols., 2017); al ser el mismo conjunto de datos, se logró comparar los estadísticos obtenidos con el logaritmo contra los reportados en el estudio citado, esto a través del cálculo del porcentaje de variación. Se confirmó que el pipeline es capaz de discriminar, dentro de una misma base de datos, casos de oncocercosis, confirmados parasitológicamente, de otras parasitosis. Además de esto, se logró calcular el punto de corte, AUC y parámetros de validación de la prueba para tres diferentes antígenos (OV16, OV17 y OV33) y dos inmunoglobulinas (IgG e IgG4). Dentro del pipeline se generó una curva ROC cuyo

análisis permite cuantificar qué tan precisa es una prueba diagnóstica para discriminar entre pacientes “enfermos” y “no enfermos”. Derivado de esta curva, se obtiene el AUC, que se esperaría fuera  $\geq 0.9$ , junto con los puntos de corte tal y como se mostró en la Figura 6.1 y Tabla 6.2 (véase sección de resultados) (Hajian-Tilaki, 2013). Para IgG4, la curva ROC se presentó alejada de la diagonal y con AUC de 0.983, indicando que este método es lo suficientemente preciso para ser utilizada como herramienta de diagnóstico. También se colocó el cálculo de la sensibilidad y especificidad, ya que son considerados como los parámetros de validación para una prueba diagnóstica; se esperaba encontrar una relación inversamente proporcional entre estos (Parikh y cols., 2008). Lo cual se comprobó en el Tabla 6.3, sección de resultados, donde OV16 IgG4 reportó una especificidad de 1.00 y sensibilidad de 0.96. Misma tendencia que se observa en los demás valores resultantes del análisis de prueba.

Al comparar los valores de OV16 obtenidos con el pipeline contra los reportados en Feeser y colaboradores (2017) se observó un porcentaje de variación superior al 10%, sobre todo en los puntos de corte, como se puede observar en el Tabla 6.4. Esto es porque a diferencia del estudio citado, los puntos de corte reportados con el pipeline fueron calculados a partir de las MFI sin la señal de la proteína de fusión Glutación S-transferasa (GST). Dicha señal se substrajo para obtener la reactividad específica de la IgG4 sérica al antígeno recombinante OV16 y eliminar el ruido producido por reacciones inespecíficas o potenciales reacciones cruzadas con la GST (Dobaño y cols., 2008; Tetteh y cols., 2020). Cabe mencionar que al no haber probado el pipeline con una base mayor a 610 datos no se conoce el punto en que este deja de funcionar de manera óptima, por lo cual se recomienda que durante la validación se realicen pruebas con bases con mayor cantidad de datos.

Se trabajó los PNO para el ensayo con OV16 debido a que el nematodo lo expresa durante toda su vida y es específica del mismo, su capacidad diagnóstica ha sido ampliamente documentada y por ello es considerado como el antígeno estándar para la detección de *O. volvulus*. Mientras tanto, OV17 se expresa en estadios específicos del nematodo y presenta secuencias homólogas en *Onchocerca gibson*, *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*; al igual OV33 presenta homología con *Ascaris suum*, *Mansonella perstans* y *B. malayi* (Feeser y cols., 2017; Krushna y cols., 2009). Debido a que ambos tienen una alta probabilidad de reacción cruzada con otras filariasis, se les descarta como antígenos diagnósticos pues se corre el riesgo de obtener falsos positivos. Pero se utilizan como parámetro de comparación porque poseen una alta sensibilidad y especificidad. Como en el caso de OV33 cuyo ELISA reporta una sensibilidad 93.0% y especificidad de 96.0% (Bennuru y cols., 2020; Unnasch y cols., 2018).

El protocolo se elaboró para la detección de anticuerpos IgG4 debido a que presenta una mayor sensibilidad y especificidad en comparación a los anticuerpos IgG, esto se debe a un fenómeno propio de las inmunoglobulinas G4 llamado “intercambio del brazo Fab”. Durante esta reacción las cadenas pesadas del anticuerpo se separan y re-asocian de manera aleatoria con otras cadenas, dando paso a la formación de anticuerpos asimétricos biespecíficos y monovalentes. Esto evita que exista una reacción cruzada con antígenos similares y por ende aumenta su especificidad y sensibilidad (Nirula, Glaser, Kalled, y Taylora, 2011; Rispen, Ooijsaar-de Heer, Bende, y Aalberse, 2011). Esto se comprobó al identificar que las sensibilidades más cercanas a 1 pertenecían a los resultados obtenidos de IgG4, específicamente de OV16 con 0.95 y OV33 con 0.95 (Tabla 6.3 sección de resultados).

---

### Conclusiones

---

Se elaboró un protocolo detallado para el acoplamiento de los antígenos OV16, OV17 y OV33 de *O. volvulus* a las microesferas xMAP<sup>®</sup>, mismo que puede ser modificado para el acoplamiento de otros antígenos característicos de ETDs de la región, para ensayos de respuesta de anticuerpos IgG e IgG4.

Se elaboró un protocolo operacional estandarizado específico para la determinación de las condiciones de corrida del ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33.

Se elaboró un pipeline en R capaz de analizar los resultados de un ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos contra antígenos recombinantes de *O. volvulus*. La interpretación de los estadísticos desplegados permite hacer determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba, así como otros parámetros de validación.

---

### Recomendaciones

---

Se recomienda llevar a cabo la validación de los protocolos elaborados en este estudio en el laboratorio, con el fin de poder implementar esta herramienta en la vigilancia epidemiológica post-eliminación de la oncocercosis.

Se recomienda diseñar protocolos para la implementación de ensayos múltiplex que evalúen antígenos de otras ETDs endémicas de la región y realizar a su vez la validación de los mismos para su pronta implementación.

La existencia de este protocolo de detección de la respuesta de anticuerpos IgG e IgG4 a los antígenos OV16, OV17 y OV33 de *O. volvulus* permitirá evaluar la utilidad de esta técnica para la vigilancia epidemiológica post-eliminación de la transmisión de la oncocercosis, mediante el uso de una herramienta de alta sensibilidad y especificidad.

- Adler, P. H., Hamada, N., Cavalcante do Nascimento, J. M., y Grillet, M. E. (2017). River-specific macrogenomic diversity in *simulium guianense* s. l. (diptera: Simuliidae), a complex of tropical american vectors associated with human onchocerciasis. *Plos one*, *12*(7), e0181679.
- Adler, P. H., y McCreddie, J. W. (2019). Black flies (simuliidae). En *Medical and veterinary entomology* (pp. 237–259). Elsevier.
- Atif, M., Estrada-Mondragon, A., Nguyen, B., Lynch, J. W., y Keramidas, A. (2017). Effects of glutamate and ivermectin on single glutamate-gated chloride channels of the parasitic nematode *h. contortus*. *PLoS pathogens*, *13*(10), e1006663.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of elisa, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using elisa. *Peptides*, *72*, 4–15.
- Bennuru, S., Oduro-Boateng, G., Osigwe, C., Del Valle, P., Golden, A., Ogawa, G. M., . . . Nutman, T. B. (2020). Integrating multiple biomarkers to increase sensitivity for the detection of onchocerca volvulus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *221*(11), 1805–1815.
- Boatin, B. A., y Richards Jr, F. O. (2006). Control of onchocerciasis. *Advances in parasitology*, *61*, 349–394.
- Boivin, G., Côté, S., Déry, P., De Serres, G., y Bergeron, M. G. (2004). Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *Journal of clinical Microbiology*, *42*(1), 45–51.
- Botto, C., Basañez, M.-G., Escalona, M., Villamizar, N. J., Noya-Alarcón, O., Cortez, J., . . . others (2016). Evidence of suppression of onchocerciasis transmission in the venezuelan amazonian focus. *Parasites & vectors*, *9*(1), 40.
- Bradley, J. E., Tuan, R. S., Shepley, K. J., Tree, T. I., Maizels, R. M., Helm, R., . . . Unnasch, T. R. (1993). Onchocerca volvulus: characterization of an immunodominant hypodermal antigen present in adult and larval parasites. *Experimental parasitology*, *77*(4), 414–424.
- Brattig, N. (2004). Pathogenesis and host responses in human onchocerciasis: impact of onchocerca filariae and wolbachia endobacteria. *Microbes and infection*, *6*(1), 113–128.
- Breen, E. J. (2017). Protein multiplexed immunoassay analysis with r. En *Serum/plasma proteomics* (pp. 495–537). Springer.
- Breen, E. J., Tan, W., y Khan, A. (2016). The statistical value of raw fluorescence signal in luminex xmap based multiplex immunoassays. *Scientific reports*, *6*, 26996.
- Burbelo, P. D., Leahy, H. P., Iadarola, M. J., y Nutman, T. B. (2009). A four-antigen mixture for rapid assessment of onchocerca volvulus infection. *PLoS Negl Trop Dis*, *3*(5), e438.
- Burbelo, P. D., Lebovitz, E. E., y Notkins, A. L. (2015). Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Translational Research*, *165*(2), 325–335.

- Burton, M. J. (2009). Corneal blindness: prevention, treatment and rehabilitation. *Community Eye Health*, 22(71), 33–35.
- Cama, V. A., McDonald, C., Arcury-Quandt, A., Eberhard, M., Jenks, M. H., Smith, J., ... others (2018). Evaluation of an ov-16 igg4 enzyme-linked immunosorbent assay in humans and its application to determine the dynamics of antibody responses in a non-human primate model of onchocerca volvulus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(4), 1041–1048.
- Carvajal, Saldarriaga, J. G. Z., Escudero, J. C. S., y Restrepo, D. D. (2016). Oncocercosis: de lo básico a lo clínico. *Medicina UPB*, 35(2), 111–119.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018). *Developing an IQCP a step-by-step guide*. Descargado de <https://www.cdc.gov/labquality/docs/IQCP-Layout.pdf>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). *Onchocerciasis*. Descargado de <https://www.cdc.gov/dpdx/onchocerciasis/index.html>
- Chen, I.-S., y Kubo, Y. (2018). Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *The Journal of Physiology*, 596(10), 1833–1845.
- Chiu, N., y Christopoulos, T. K. (2012). *Advances in immunoassay technology*. BoD–Books on Demand.
- Cobb, R., y Boeckh, A. (2009). Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites & vectors*, 2(S2), S5.
- Cox, K. L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Manetta, J., Montrose, C., y Sittampalam, S. (2019). Immunoassay methods. En *Assay guidance manual [internet]* (pp. 1–39). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Crump, A., y Omura, S. (2011). Ivermectin, ‘wonder drug’ from japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87(2), 13–28.
- Cupp, E., Sauerbrey, M., y Richards, F. (2011). Elimination of human onchocerciasis: history of progress and current feasibility using ivermectin (mectizan®) monotherapy. *Acta tropica*, 120, S100–S108.
- Cupp, E. W., Mackenzie, C. D., y Unnasch, T. R. (2011). Importance of ivermectin to human onchocerciasis: past, present, and the future. *Research and reports in Tropical medicine*, 2, 81.
- Debrah, A. Y., Specht, S., Klarmann-Schulz, U., Batsa, L., Mand, S., Marfo-Debrekyei, Y., ... others (2015). Doxycycline leads to sterility and enhanced killing of female onchocerca volvulus worms in an area with persistent microfilaridermia after repeated ivermectin treatment: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Clinical Infectious Diseases*, 61(4), 517–526.
- Dieye, Y., Storey, H. L., Barrett, K. L., Gerth-Guyette, E., Di Giorgio, L., Golden, A., ... others (2017). Feasibility of utilizing the sd bioline onchocerciasis igg4 rapid test in onchocerciasis surveillance in senegal. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(10), e0005884.
- Dobaño, C., Rogerson, S. J., Mackinnon, M. J., Cavanagh, D. R., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., y McBride, J. S. (2008). Differential antibody responses to plasmodium falciparum merozoite proteins in malawian children with severe malaria. *The Journal of infectious diseases*, 197(5), 766–774.
- Eckels, J., Nathe, C., Nelson, E. K., Shoemaker, S. G., Van Nostrand, E., Yates, N. L., ... others (2013). Quality control, analysis and secure sharing of luminex® immunoassay data using the open source labkey server platform. *BMC bioinformatics*, 14(1), 145.
- Enk, C. D. (2006). Onchocerciasis—river blindness. *Clinics in dermatology*, 24(3), 176–180.
- Feeser, K. R., Cama, V., Priest, J. W., Thiele, E. A., Wiegand, R. E., Lakwo, T., ... Cantey, P. T. (2017). Characterizing reactivity to onchocerca volvulus antigens in multiplex bead assays. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 666–672.
- Fink, D. L., Fahle, G. A., Fischer, S., Fedorko, D. F., y Nutman, T. B. (2011). Toward molecular parasitologic diagnosis: enhanced diagnostic sensitivity for filarial infections in mobile populations. *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 42–47.
- Fonseca, A. M., Quinto, L., Jiménez, A., González, R., Bardají, A., Maculve, S., ... others (2017). Multiplexing detection of igg against plasmodium falciparum pregnancy-specific antigens.

- PLoS One*, 12(7), e0181150.
- Griswold, E., Unnasch, T., Eberhard, M., Nwoke, B. E., Morales, Z., Muheki Tukahebwa, E., ... others (2018). The role of national committees in eliminating onchocerciasis. *International Health*, 10(suppl\_1), i60–i70.
- Gustavsen, K., Hopkins, A., y Sauerbrey, M. (2011). Onchocerciasis in the Americas: From arrival to (near) elimination. *Parasites and Vectors*, 4(1), 2–7. doi: 10.1186/1756-3305-4-205
- Hajian-Tilaki, K. (2013). Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(2), 627–635.
- Herrera, S. (2013). *Migración en Guatemala: un enfoque periodístico* (Inf. Téc.). Descargado de <http://sitios.usac.edu.gt/cunsur/wp-content/uploads/2013/07/CICLO-4-TEOR?A-PEDAGOGICA-DEL-NIVEL-MEDIO.pdf>
- Higazi, T. B., Filiano, A., Katholi, C. R., Dadzie, Y., Remme, J. H., y Unnasch, T. R. (2005). Wolbachia endosymbiont levels in severe and mild strains of *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 141(1), 109–112. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.02.006
- Hoerauf, A., Mand, S., Adjei, O., Fleischer, B., y Büttner, D. W. (2001). Depletion of wolbachia endobacteria in onchocerca volvulus by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *The Lancet*, 357(9266), 1415 - 1416. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04581-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04581-5)
- Hopking, A., y Boatman, B. (2011). Onchocerciasis: water and sanitation related diseases. En *Water and sanitation-related diseases and the environment: challenges, interventions, and preventive measures* (pp. 113–149). Atlanta: John Wiley & Sons.
- Houser, B. (2012). Bio-rad's bio-plex® suspension array system, xmap technology overview. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118(4), 192-196. doi: 10.3109/13813455.2012.705301
- Instituto Nacional de Salud Colombia [INS]. (2014). *Protocolo de vigilancia en salud pública de Oncocercosis*. Descargado de <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PROOncocercosis.pdf>
- Keating, J., Yukich, J. O., Mollenkopf, S., y Tediosi, F. (2014). Lymphatic filariasis and onchocerciasis prevention, treatment, and control costs across diverse settings: A systematic review. *Acta Tropica*, 135, 86 - 95. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.017>
- Khan, S. S., Smith, M. S., Reda, D., Suffredini, A. F., y McCoy Jr., J. P. (2004). Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: Comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 61B(1), 35-39. doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20021>
- Koroma, J. B., Sesay, S., Conteh, A., Koudou, B., Paye, J., Bah, M., ... Bockarie, M. J. (2018). Impact of five annual rounds of mass drug administration with ivermectin on onchocerciasis in Sierra Leone. *Infectious Diseases of Poverty*, 7(1), 1–12. doi: 10.1186/s40249-018-0410-y
- Krushna, N. S. A., Shiny, C., Dharanya, S., Sindhu, A., Aishwarya, S., y Narayanan, R. B. (2009). Immunolocalization and serum antibody responses to brugia malayi pepsin inhibitor homolog (bm-33). *Microbiology and Immunology*, 53(3), 173-183. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00114.x>
- Lagatie, O., Verheyen, A., Nijs, E., Van Dorst, B., Debrah, L. B., Debrah, A., ... Stuyver, L. J. (2018). Evaluation of the diagnostic performance of *Onchocerca volvulus* linear epitopes in a peptide enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(3), 779–785. doi: 10.4269/ajtmh.17-0756
- Laing, R., Gillan, V., y Devaney, E. (2017). Ivermectin – old drug, new tricks? *Trends in Parasitology*, 33(6), 463 - 472. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>
- Lawrence, Joni, Sodahlon, y K, Y. (2018). Onchocerciasis: the beginning of the end. *International Health*, 10(S1), i1-i2. doi: 10.1093/inthealth/ihx070
- Lobos, E., Weiss, N., Karam, M., Taylor, H., Ottesen, E., y Nutman, T. (1991). An immunogenic onchocerca volvulus antigen: a specific and early marker of infection. *Science*, 251(5001), 1603–1605. doi: 10.1126/science.2011741
- Lucius, R., Schulz-Key, H., Büttner, D. W., Kern, A., Kaltmann, B., Prod'Hon, J., ... Diesfeld, H. J. (1988). Characterization of an immunodominant *Onchocerca Volvulus* antigen with patient sera and a monoclonal antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 167(4), 1505–1510. doi:

10.1084/jem.167.4.1505

- Luminex®. (2011). Coupling assessment. En *xmap® antibody coupling kit user manual* (pp. 14–16). Luminex® Corporation. Descargado de <https://www.ld.ru/w/multiplex/manualabc.pdf>
- Luminex®. (2018). *xMAP cookbook* (3rd ed.). Luminex® Corporation. Descargado de <https://www.luminexcorp.com/blog/new-alternative-coupling-problematic-proteins-luminex-xmap-microspheres/downloadxmapcookbook/>
- Luminex® Corporation. (2011). *MAGPIX® user quick guide 4.2* (Inf. Téc.). Austin.
- Mantilla, J. S., Moncada, L. I., Matta, N. E., y Adler, P. H. (2014). Oviposition behavior and microstructure of the eggs of *Simulium dinelli* (Joan) (Diptera: Simuliidae). *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 217–220. doi: 10.15446/abc.v20n1.43149
- Meredith, S. E., Lando, G., Gbakima, A. A., Zimmerman, P. A., y Unnasch, T. R. (1991). *Onchocerca volvulus*: Application of the polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Experimental Parasitology*, 73(3), 335 - 344. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90105-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90105-6)
- Meredith, S. E., Unnasch, T. R., Karam, M., Piessens, W. F., y Wirth, D. F. (1989). Cloning and characterization of an onchocerca volvulus specific dna sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36(1), 1 - 10. doi: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90194-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90194-1)
- Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social [MSPAS]. (2018). *Protocolos de vigilancia epidemiológica: enfermedades vectoriales de origen parasitario*. Descargado de <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Lineamientos/PR00ncocercosis.pdf>
- Nirula, A., Glaser, S. M., Kalled, S. L., y Taylor, F. R. (2011). What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. *Current Opinion in Rheumatology*, 23(1), 119–124. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283412fd4
- Onchocerciasis Elimination Program for the Americas (OEPA). (2019). *Venezuela*. Descargado de <http://www.oepa.net/venezuela.html>
- Ono, K., Hiratsuka, Y., y Murakami, A. (2010). Global inequality in eye health: Country-level analysis from the global burden of disease study. *American Journal of Public Health*, 100(9), 1784–1788. doi: 10.2105/AJPH.2009.187930
- Organización Panamericana de la Salud (PAO). (2018). *Verificación de la eliminación de Oncocercosis en Guatemala*. Descargado de [https://www.paho.org/gut/index.php?option=com\\_content&view=article&id=880:verificacion-de-eliminacion-de-oncocercosis-en-guatemala&Itemid=441](https://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=880:verificacion-de-eliminacion-de-oncocercosis-en-guatemala&Itemid=441)
- Osei-Atweneboana, M. Y., Awadzi, K., Attah, S. K., Boakye, D. A., Gyapong, J. O., y Prichard, R. K. (2011). Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in onchocerca volvulus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5, 1-11. doi: 10.1371/journal.pntd.0000998
- Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra Sekhar, G., y Thomas, R. (2008). Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology*, 56(4), 341. doi: 10.4103/0301-4738.41424
- Pedram, B., Pasquetto, V., Drame, P. M., Ji, Y., Gonzalez-Moa, M. J., Baldwin, R. K., ... Biamonte, M. A. (2017, 07). A novel rapid test for detecting antibody responses to loa loa infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), 1-14. doi: 10.1371/journal.pntd.0005741
- Prevot, K. (2015). *Wolbachia*. Descargado de <https://embryo.asu.edu/pages/wolbachia>
- R Core Team. (2020). *RStudio*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Descargado de <http://www.r-project.org/>
- Richards, Katarbarwa, M., Bekele, F., Tadesse, Z., Mohammed, A., Sauerbrey, M., ... Unnasch, T. R. (2018). Operational performance of the onchocerca volvulus “oepa” ov16 elisa serological assay in mapping, guiding decisions to stop mass drug administration, and posttreatment surveillance surveys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(3), 749–752. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0341>
- Richards, F., Rizzo, N., Diaz Espinoza, C. E., Monroy, Z. M., Crovella Valdez, C. G., de Cabrera, R. M., ... Domínguez, A. (2015). One hundred years after its discovery in guatemala by rodolfo robles, onchocerca volvulus transmission has been eliminated from the central endemic zone. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(6), 1295–1304. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0364>

- Rispens, T., Ooijsaar-de Heer, P., Bende, O., y Aalberse, R. C. (2011). Mechanism of immunoglobulin g4 fab-arm exchange. *Journal of the American Chemical Society*, 133(26), 10302-10311. doi: 10.1021/ja203638y
- Rodríguez, y Lizarazo. (2010). Revisión epidemiológica de la oncocercosis en américa latina. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 28(1). Descargado de <https://revistas.udea.edu.co/index.php/fnsp/article/view/2428>
- Rodríguez-Pérez, M. A., Domínguez-Vázquez, A., Méndez-Galván, J., Sifuentes-Rincón, A. M., Larralde-Coronal, P., Barrera-Saldaña, H. A., y Bradley, J. E. (2003, 10). Antibody detection tests for *Onchocerca volvulus*: comparison of the sensitivity of a cocktail of recombinant antigens used in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay with a rapid-format antibody card test. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 539-541. doi: 10.1016/S0035-9203(03)80018-4,
- Sanz, H., Aponte, J. J., Harezlak, J., Dong, Y., Ayestaran, A., Nhabomba, A., ... Valim, C. (2017). drlumi: An open-source package to manage data, calibrate, and conduct quality control of multiplex bead-based immunoassays data analysis. *PLOS ONE*, 12(11), 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0187901
- Sauerbrey, M., Rakers, L. J., y Richards, F. O. (2018). Progress toward elimination of onchocerciasis in the Americas. *International Health*, 10(S1), i71-i78. doi: 10.1093/inthealth/ihx039
- Shaw, W. R., y Catteruccia, F. (2019). Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology*, 4(1), 20-34. doi: 10.1038/s41564-018-0214-7
- Song, D., Liang, H., Qu, B., Li, Y., Liu, J., Chen, C., ... Gao, A. (2018). Moxidectin inhibits glioma cell viability by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncology Reports*, 40(3), 1348-1358. doi: 10.3892/or.2018.6561
- Takaoka, H., y Suzuki, T. (2015). Epidemiology and control of guatemalan onchocerciasis. *Tropical Medicine and Health*, 43(1987), 87-94. doi: 10.2149/tmh.2015-S13
- Tang, T.-H. T., LÁ-VÁ, R., Lanza, M., Shelley, A. J., Rubio, J. M., y Luz, S. A. L. B. (2010, 09). Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. *Mem.Ádo Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 823 - 828. doi: 10.1590/S0074-02762010000600016
- Tetteh, K. K., Wu, L., Hall, T., Ssewanyana, I., Oulton, T., Patterson, C., ... Drakeley, C. (2020). Optimisation and standardisation of a multiplex immunoassay of diverse *Plasmodium falciparum* antigens to assess changes in malaria transmission using sero-epidemiology. *Wellcome Open Research*, 4(26), 1-22. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14950.2
- Thiele, E. A., Cama, V. A., Lakwo, T., Mekasha, S., Abanyie, F., Sleshi, M., ... Cantey, P. T. (2016). Detection of *onchocerca volvulus* in skin snips by microscopy and real-time polymerase chain reaction: Implications for monitoring and evaluation activities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 906-911. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0695>
- Tilgner, E. H. (2009). Chapter 194 - phasmida: Stick and leaf insects. En V. H. Resh y R. T. Cardé (Eds.), *Encyclopedia of insects (second edition)* (Second Edition ed., pp. 765 - 766). San Diego: Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00203-4>
- Udall, D. N. (2007, 01). Recent Updates on Onchocerciasis: Diagnosis and Treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 44(1), 53-60. doi: 10.1086/509325
- Unnasch, T. R., Golden, A., Cama, V., y Cantey, P. T. (2018, 02). Diagnostics for onchocerciasis in the era of elimination. *International Health*, 10(S1), i20-i26. doi: 10.1093/inthealth/ihx047
- van Erkel, A. R., y Pattynama, P. M. (1998). Receiver operating characteristic (roc) analysis: Basic principles and applications in radiology. *European Journal of Radiology*, 27(2), 88 - 94. doi: [https://doi.org/10.1016/S0720-048X\(97\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0720-048X(97)00157-5)
- Vlaminck, J., Fischer, P. U., y Weil, G. J. (2015). Diagnostic tools for onchocerciasis elimination programs. *Trends in Parasitology*, 31(11), 571 - 582. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.007>
- Wang, Y., Steele, T., y Zhang, E. (2016). *QQ plot* (Vol. 10; Inf. Téc.). College of Liberal Arts & Sciences. Descargado de <https://math.illinois.edu/system/files/inline-files/Proj9AY1516-report2.pdf>
- Williamson, P., y Kendrick. (1989). The box plot: A simple visual method to interpret data. *Annals*

- of Internal Medicine*, 110(11), 916-921. doi: 10.7326/0003-4819-110-11-916
- Wilson, K. J., y Rigakos, B. (2016). Scientific process flowchart assessment (spfa): A method for evaluating changes in understanding and visualization of the scientific process in a multidisciplinary student population. *CBE—Life Sciences Education*, 15(4), ar63. doi: 10.1187/cbe.15-10-0212
- Wolstenholme, A. J. (2012). Glutamate-gated chloride channels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40232–40238. doi: 10.1074/jbc.R112.406280
- Won, J.-H., Goldberger, O., Shen-Orr, S. S., Davis, M. M., y Olshen, R. A. (2012). Significance analysis of xmap cytokine bead arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(8), 2848–2853. doi: 10.1073/pnas.1112599109
- World Health Organization. (2020). *Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for Neglected Tropical Diseases 2021-2030* (Inf. Téc. n.º 5). Descargado de <https://www.who.int/neglected{ }diseases/Ending-the-neglect-to-attain-the-SDGs--NTD-Roadmap.pdf?ua=1>
- World Health Organization (WHO). (2009). *Good clinical laboratory practice (GCLP)*. CDC.
- World Health Organization (WHO). (2016). *Guidelines for stopping mass drug administration and verifying elimination of human onchocerciasis* (Inf. Téc.). Descargado de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204180/9789241510011{ }eng.pdf;jsessionid=CA0DA581D29915FC562E5C55BCBA348E?sequence=1>
- World Health Organization (WHO). (2019). Onchocerciasis. Descargado de <https://www.who.int/gho/neglected{ }diseases/onchocerciasis/en/>
- Wu, Y., Egerton, G., Pappin, D. J., Harrison, R. A., Wilkinson, M. C., Underwood, A., y Bianco, A. E. (2004). The secreted larval acidic proteins (slaps) of onchocerca spp. are encoded by orthologues of the alt gene family of brugia malayi and have host protective potential. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(2), 213 - 224. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.002>
- Zouboulis, C. C. (2018). *Pigmented ethnic skin and imported dermatoses*. doi: 10.1007/978-3-319-69422-1

# CAPÍTULO 11


---

Anexo


---

## A. PNO

A.1 Inicio y apagado del equipo Luminex®MAGPIX®.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.00</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Inicio y apagado del equipo Luminex® MAGPIX®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b> <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

1. **Propósito:** Preparar el equipo multiplex MAGPIX® de Luminex® previo a realizar una corrida asegura que el instrumento esté operando de manera correcta, esto asegurará en parte la calidad de los resultados obtenidos. Prepararlo para el apagado, evitando la formación de cristales o aglomerados de sal en la sonda, que podrían dañar el equipo.
2. **Aplicación:** Investigación.
3. **Referencias:**
  - 3.1 Luminex® Corporation. (2011). *MAGPIX® User Quick Guide 4.2*. Luminex® Corporation. <https://www.fresnostate.edu/csm/rimi/documents/equipment/MagPix®.pdf>
  - 3.2 MERCK®. (2017). *User Quick Guide Developed for Luminex® MAGPIX®*
4. **Terminología y abreviaturas:**
  - 4.1 Cdm: Comandos
  - 4.2 DI: desionizada
5. **Principio:** El equipo Luminex® MAGPIX utiliza perlas, con diferentes colores, para llevar a cabo ensayos de detección. Cada una de las perlas puede ser recubierta con diferentes moléculas de captura, como ácidos nucleicos y proteínas, específicos para un blanco biológico. Esto permite la captura y detección de múltiples analitos, provenientes de una misma muestra.
6. **Documentos asociados:**
  - 6.1 PNO #6.1: Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®
7. **Seguridad:**
  - 7.1 Antes de cualquier procedimiento el investigador deberá de haber leído el manual del equipo.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.00</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Inicio y apagado del equipo Luminex<sup>®</sup> MAGPIX<sup>®</sup></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b> <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>


7.2 Utilizar bata de laboratorio, guantes y lentes de protección durante todo el proceso.

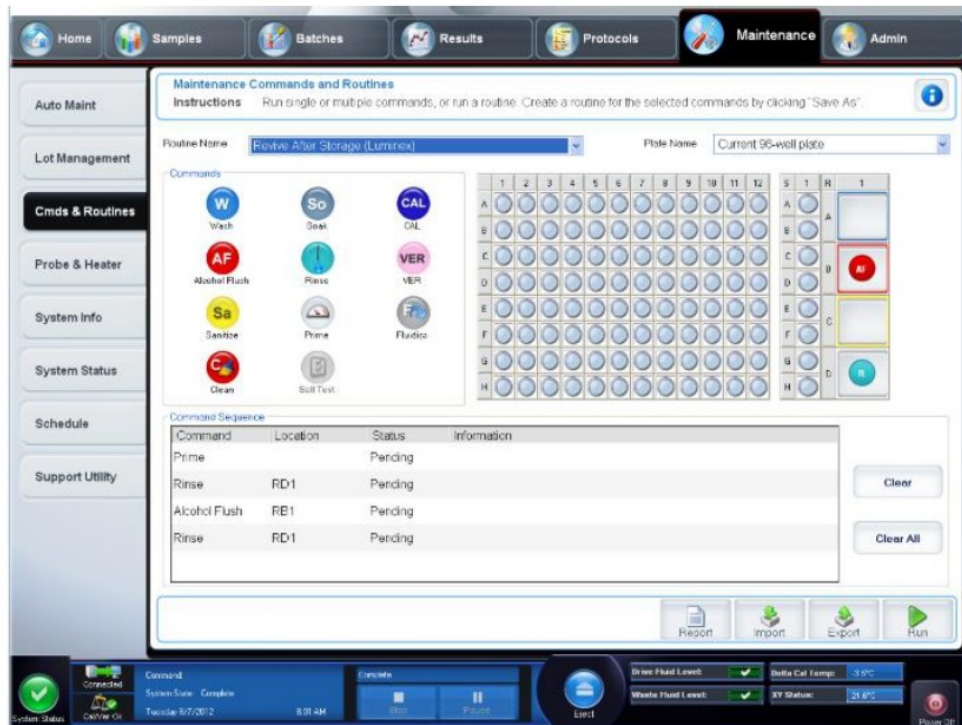
**8. Equipos, materiales y reactivos:**

- 8.1 Equipo Luminex<sup>®</sup> MAGPIX<sup>®</sup> (16047702)
- 8.2 Etanol 70% (v/v)
- 8.3 Agua DI
- 8.4 Cloro 10% (v/v)
- 8.5 Cloro 20% (v/v)
- 8.6 Descarte para solventes no halógenos


**9. Procedimiento:**

- 9.1 *Inicio del ordenador* Prenda el computador como lo haría con cualquier otro ordenador. Una vez en dentro haga click en el icono de xPONENT Luminex,.
- 9.1 *Para iniciar del sistema.* Pulsar la pestaña de **Maintenance**, una vez dentro ubicarse en el lado izquierdo de la ventana y pulsar **Cmds & Routines**.
- 9.2 Dirigirse a la opción **Routine Name**, que se encuentra en la parte superior de la ventana y seleccionar la opción **Revive After Storage**.

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.00</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Inicio y apagado del equipo Luminex® MAGPIX®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b> <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>



- 9.3 Dirigirse a la esquina inferior derecha y pulsar **Eject** y agregar etanol al 70% (v/v) al pocillo RB1 hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad. Los demás pocillos deberán quedar vacíos.
- 9.4 Siempre en la esquina inferior derecha de la ventana de **Cmts & Routines** presionar **Retract** y **Run**.
- 9.5 Retomar a la pestaña **Home** y pulsar **System Initialization**. Durante todo el proceso el pocillo deberá siempre de contener etanol al 70% (v/v).
- 9.6 Una vez finalizado el paso anterior volver a pulsar **Run**.
- 9.7 *Apagado del sistema.* Ubicarse en la pestaña de **Maintenance**, una vez dentro, ubicarse en el lado izquierdo de la ventana y pulsar **Auto Maint**.
- 9.8 Cuando el proceso de auto maint finalice pulsar **Eject**, que se ubica en la parte inferior en el centro de la pantalla.
- 9.9 Luego ubicar el pocillo RA1 y llenar hasta  $\frac{3}{4}$  de su volumen con agua DI.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.00</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Inicio y apagado del equipo Luminex<sup>®</sup> MAGPIX<sup>®</sup></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b> <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

**9.10** Ubicar el pocillo RC1 y llenar hasta  $\frac{3}{4}$  de su volumen con cloro al 10% (v/v) o 20% (v/v)

**9.11** Pulsar **Retract** y **Run**. *Recordar que el pocillo RD1 deberá de permanecer vacío durante todo el proceso.*

**10. Cálculos:**

**10.1** No aplica


**11. Control de calidad:**

**11.1** En caso que alguno de los pasos de la rutina no funcione revisar el manual del equipo. Si no logra solucionar el problema, comunicarse con su supervisor inmediato y con el representante de la casa comercial Lic. Andres Moreira([andres.moreira@merckgroup.com](mailto:andres.moreira@merckgroup.com)).


**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

**12.1** Registrar en el cuaderno de laboratorio respectivo cuándo se corrieron estos programas de preparación, colocando la fecha y el nombre del investigador que los realizó

A.2 Calibración y verificación del equipo Luminex®MAGPIX®.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.01</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b> <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

1. **Propósito:** Antes de una corrida es necesario calibrar el equipo para configurar el sistema y asegurar que las microesferas se clasifiquen de manera óptima y consistente durante la corrida. Por otro lado la verificación confirmará que el analizador esté funcionando de manera correcta
2. **Aplicación:** Investigación.
3. **Referencias:**
  - 3.1 Luminex® Corporation. (2011). *MAGPIX® user quickguide 4.2*. Luminex® Corporation. <https://www.fresnostate.edu/csm/rimi/documents/equipment/MagPix®.pdf>
4. **Terminología y abreviaturas:**
  - 4.1 CD: Disco compacto, por sus siglas en inglés.
  - 4.2 CAL: calibración
  - 4.3 VER: verificación
  - 4.4 F1: Fluidos 1
  - 4.5 F2: Fluidos 2
5. **Principio:** Durante la calibración lo que se hace es una normalización de la configuración del sistema, utilizando como base la información encontrada en el CD CAL, mientras tanto la verificación utiliza los controles internos del sistema para asegurar que el analizador esté funcionando según los parámetros establecidos en la calibración anterior. parámetros del sistema.
6. **Documentos asociados:**
  - 6.1 PNO # 6.00: Inicio y apagado del equipo Luminex® MAGPIX®

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.01</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

**7. Seguridad:**


- 7.1 Leer el manual del equipo antes de empezar cualquier procedimiento que involucre el uso del equipo.
- 7.2 Verificar las fechas de vencimiento de los kits de calibración y verificación.
- 7.3 Utilizar bata de laboratorio durante todo el procedimiento.

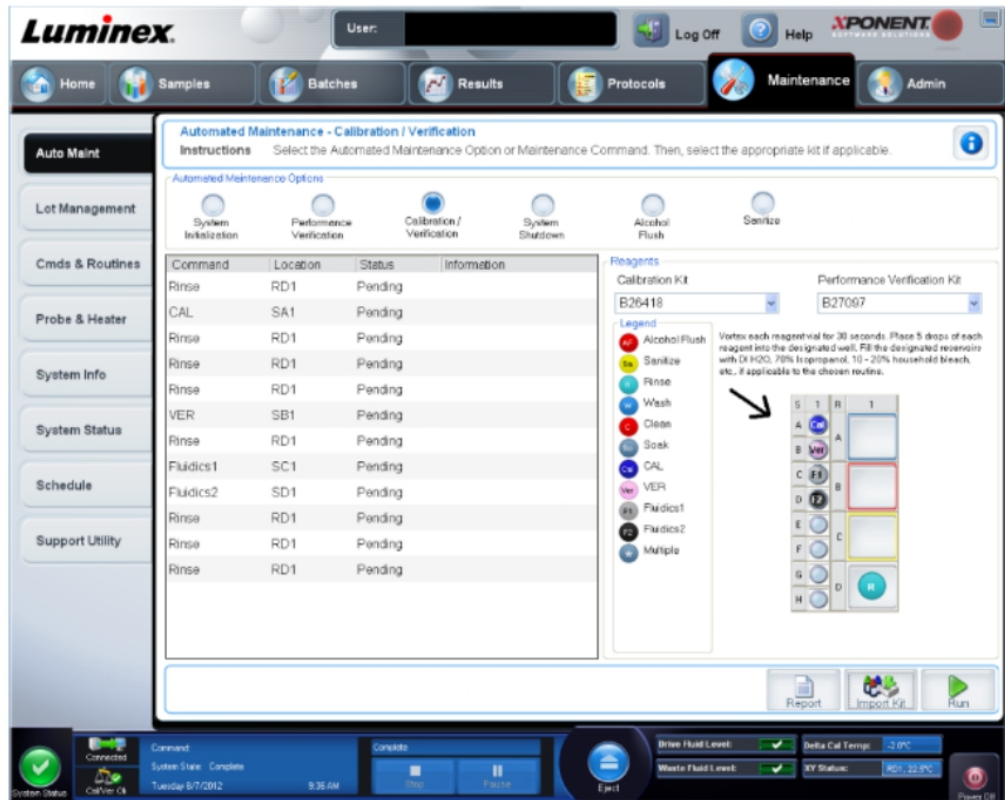
**8. Equipos, materiales y reactivos:**

- 8.1 Equipo Luminex® MAGPIX (16047702)
- 8.2 Kit de calibración (Luminex®, catalogo MPSCALK25, ThermoFisher®)
- 8.3 Kit de Verificación (Luminex®, catalogo MPXPVERK25, ThermoFisher®)
- 8.4 Isopropanol 70% (v/v)
- 8.5 Etanol 70% (v/v)
- 8.6 Toalla de papel absorbente tipo Kimwipe
- 8.7 Agitador tipo Vortex
- 8.8 Piseta con agua destilada
- 8.9 Descarte para solvente no halógenos


**9. Procedimiento:**

- 9.1 Antes de empezar deberá sacar los reactivos de la refrigeradora; se recomienda que sea una hora antes de iniciar con este proceso. De esta manera estos lograrán alcanzar la temperatura ambiente. Además de esto deberá agitarlos utilizando un agitador tipo Vortex previo a su uso.
- 9.2 *La calibración deberá hacerse mensualmente, o cuando el aparato muestre el estatus del sistema (System Status) en amarillo* esto luego de la rutina de inicio. Ubicarse en la pestaña de **Maintenance** y dirigirse Al lateral izquierdo y presionar **Auto Maint**
- 9.3 Una vez aquí presionar en la opción **Calibration/Verification**, ubicada en la parte superior de la pestaña, luego colocar el CD del kit de calibración y pulsar en **Import Kit**. Se desplegará una lista, buscar en la ubicación del CD y abrir el archivo con extensión .lxl
- 9.4 En cada pozo de la tira , colocar 6 gotas de cada reactivo en el siguiente orden:  
SA1 – CAL, SB1- VER, SC1 – F1 y SD1 – F2

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.01</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>



- 9.5 Llenar el pozo RB1 hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad con isopropanol al 70% (v/v) o etanol al 70% (v/v) . Mientras el pozo de limpieza (RD1) deberá de quedar vacío.
- 9.6 Pulsar **Eject**, para que la puerta del equipo se abra, colocar la tira con los reactivos ya adicionados, dejando el a RD1 vacío.
- 9.7 Pulsar **RUN** y permitir que el aparato realice la corrida. Una vez finalizada, el equipo le indicará “Ok”, si la calibración y verificación fueron satisfactorias. En caso contrario se deberá repetir el procedimiento.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.01</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 4</b> <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

**10.1** No aplica


**11. Control de calidad:**

**11.1** En caso que alguno de los pasos de la rutina no funcione revisar el manual del equipo. Si no llegase a encontrar la solución, favor comunicarse con el proveedor del servicio Lic. Andres Moreira (andres.moreira@merckgroup.com)


**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

**12.1** En el cuaderno de laboratorio del proyecto específico se debe colocar la fecha en que se realizó la calibración y verificación, para llevar un registro de este y realizarlo al tiempo recomendado por el fabricante. Se debe colocar el número de serie de los kits utilizados para realizar estos procedimientos.

A.3 Acoplamiento de antígenos recombinantes de *O. volvulus* a las microesferas xMAP®.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.02</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b></p>
	<p><b>Acoplamiento de antígenos recombinantes de <i>O.volvulus</i> a las microesferas xMAP®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>

1. **Propósito:** Acoplamiento de los antígenos OV16, OV17 y OV33 a las microesferas xMAP® para detectar la respuesta de anticuerpos IgG e IgG4 .
2. **Aplicación:** Realizar estudios epidemiológicos de la Oncocercosis.
3. **Referencias:**
  - 3.1 Luminex. (2018). *xMAP cookbook* (3rd ed.). Luminex. <https://www.luminexcorp.com/blog/new-alternative-coupling-problematic-proteins-luminex-xmap-microspheres/downloadxmapcookbook/>
  - 3.2 Cox, K. L., Devanarayan, V., & Kriauciunas, A. (2019). Immunoassay methods. In *Assay Guidance Manual* (pp. 1–39). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
4. **Terminología y abreviaturas:**
  - 4.1 min: minutos
  - 4.2 s : segundos
  - 4.3 rpm: revoluciones por minuto
  - 4.4 mL: mililitro
  - 4.5 µL: microlitro
  - 4.6 mg: miligramo
  - 4.7 M: molar
  - 4.8 g: gramos
  - 4.9 EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)
  - 4.10 Sulfo-NHS: Sulfo- N-hydroxysulfosuccinimide
  - 4.11 PBS: solución amortiguadora de fosfatos

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.02</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b></p>
	<p><b>Acoplamiento de antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i> a las microesferas xMAP®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>

4.12 *O. volvulus*: *Onchocerca volvulus*

4.13 MES: ácido 2- (N -morfolino) etanosulfónico

4.14 BSA: albúmina de suero bovino

4.15 °C: grados Celsius

4.16 OV16: Antígeno recombinante de 16 aminoácidos específico de *O. volvulus*

4.17 OV17: Antígeno recombinante de 17 aminoácidos específico de *O. volvulus*

4.18 OV16: Antígeno recombinante de 33 aminoácidos específico de *O. volvulus*

4.19 PE: ficoeritrina

4.20 LED: Diodo emisor de luz

4.21 MFI: intensidad media fluorescente

5. **Principio:** Las microesferas o perlas son partículas de poliestireno carboxilado recubiertas de grupos carboxilo, lo que permite que se forme un enlace covalente entre las aminas primarias del antígeno OV16 y el grupo carboxilo de las esferas. Este acoplamiento permite que durante un ensayo el analito objetivo, en este caso un anticuerpo, se una a la perla. Para la detección se mezclan el complejo antígeno-anticuerpo con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (molécula reportera). El complejo recién formado es excitado por dos fuentes de luz LED que emitirá las señales de fluorescencia. Esta señal será detectada por el equipo, con la que se harán diferentes análisis.

6. **Documentos asociados:**

6.1 PNO # 6.01: Calibración y verificación del equipo Luminex ®MAGPIX®

6.2 PNO # 6.03: Verificación del acoplamiento de perlas


7. **Seguridad:**

7.1 Utilizar bata de laboratorio y guantes durante todo el procedimiento.

7.2 Los materiales descartables deben de estar limpios y previamente esterilizados por autoclave.


7.3 Descartar todos los materiales desechables dentro del descarte de materiales plásticos.

7.4 Desinfectar todas las áreas de trabajo antes y después del trabajo con etanol al 70% (v/v).

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.02</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b></p>
	<p><b>Acoplamiento de antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i> a las microesferas xMAP®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>

**8. Equipos, materiales y reactivos:**

- 8.1 Equipo Luminex® MAGPIX® (16047702)
- 8.2 Agitador tipo Vortex
- 8.3 Micropipeta de 100 a 1000µl
- 8.4 Puntas de 100 a 1000 µl
- 8.5 Papel pH
- 8.6 Microesferas xMAP®
- 8.7 Centrífuga
- 8.8 Tubos cónicos de 1.5 ml
- 8.9 Descarte de puntas
- 8.10 Refrigeradora a 4°C
- 8.11 Marcador indeleble
- 8.12 Gradilla para tubos cónicos de 1.5 mL
- 8.13 Servilletas de papel
- 8.14 Sonicador
- 8.15 Papel aluminio
- 8.16 Buffer de fosfato de sodio 0.1M (agua destilada 1L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O 3.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.9g; pH 6.2)
- 8.17 Buffer de fosfato de sodio 1% (v/v)
- 8.18 PBS 1X o buffer de acoplamiento (Agua destilada 800 ml, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g; pH 7.2)
- 8.19 EDC
- 8.20 Sulfo-NHS
- 8.21 Antígenos recombinantes OV16 en concentración de 5mg/ml
- 8.22 Agua destilada-desionizada grado molecular

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.02</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Acoplamiento de antígenos recombinantes de <i>O.volvulus</i> a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

8.23 BSA

8.24 Solución de inhibidores de proteasas (1X PBS 100ml, BSA 1g, NaN<sub>3</sub> 20µl, Tween-20 50µl)


8.25 PE

8.26 Agitador tipo Rocker


8.27 Separador magnético

## 9. Procedimiento:

- 9.1 *Previo a iniciar*
- 9.1.1 Retire todos los reactivos del refrigerador para que alcancen la temperatura ambiente; se recomienda hacer esto 20-30 min antes de iniciar. Encender el equipo 15 minutos antes de iniciar.
- 9.1.2 Resuspenda el vial de stock de microesferas sometiendo a agitación con un agitador Vortex por 10 s, seguido de una sonicación de 10s.
- 9.1.3 Pipetee con una micropipeta de 1000 uL la cantidad deseada de microesferas del stock a un tubo de centrifugación. En este caso utilizará 1.25 x 10<sup>6</sup> microesferas lo cual equivale a 1 ml. El cálculo de cuánto volumen pipetear según las microesferas deseadas se encuentra en la sección de cálculos.
- 9.1.4 Coloque este tubo de centrifugación en el separador magnético por 1-2 min. Luego, con la micropipeta de 1000 ul, retire el sobrenadante y descártelo en el contenedor de desechos.
- 9.1.45 Lave las microesferas del tubo anterior con 500 µl de buffer de fosfato de sodio 0.1M (pH 6.2)
- 9.1.6 Resuspenda las microesferas someténdolas a agitación durante 15s, seguido de una sonicación durante 30s.
- 9.2 Con una micropipeta de 1000 uL, recolecte 1000 µl de la solución anterior y transfírela a un tubo cónico de 1.5ml (el cual se denominará tubo A). Este se centrifuga durante 5 min a 13 200 rpm. Con una micropipeta retire el sobrenadante y descártelo en un contenedor de desechos identificado.
- 9.3 Al pellet de esferas obtenido el paso anterior, agregue 200µl de buffer de fosfato de sodio 0.1M (pH 6.2).
- 9.4 Agite en agitador Vortex durante 10 s, seguido de una sonicación durante 10 s. Por último centrifugue 5 min a 13,200 rpm (deberá de remover el sobrenadante como se describió en el paso 9.1.4-9.1.5). Repita el paso 9.3 una vez más.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.02</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b></p>
	<p><b>Acoplamiento de antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i> a las microesferas xMAP®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>

- 9.5** Agregue 800µl de buffer de fosfato de sodio 0.1M (pH 6.2) al pellet de esferas, agite la solución con un agitador Vortex hasta que se homogenice.
- 9.6** Prepare dos soluciones: una de EDC y otra de Sulfo-NHS, utilizando el buffer de fosfato 0.1M (pH 6.2); para ambas soluciones la concentración final deberá ser 50 mg/ml.
- 9.7** Agregue 100µl, de cada una de estas soluciones, al tubo A.
- 9.8** Mezcle con agitador Vortex durante 10 s y luego deje incubando a temperatura ambiente en un agitador tipo Rocker a 700 rpm por 20 min. Durante este tiempo el tubo A debe de protegerse de la luz.
- 9.9** Durante el tiempo de incubación retire al antígeno del refrigerador y deje que llegue a temperatura ambiente.
- 9.10** Posterior a la incubación, centrifugue durante 5 min a 13,200 rpm y descarte el sobrenadante como se describe en el paso 9.1.4-9.1.5.
- 9.11** Lave el tubo A con 200µl de buffer de fosfato de sodio 0.1M (pH 6.2), mezcle con agitador Vortex durante 10 s y centrifugue durante 5 min a 13,200 rpm
- 9.12** Descarte el sobrenadante y repita los pasos 9.8 -9.9 una vez más.
- 9.13** Re suspenda el pellet en buffer de acoplamiento (PBS 1X, pH 7.2 o MES 0.05M, pH 5.0) y agregue el antígeno OV16 de *O. volvulus* a una concentración final de 5µg/10<sup>6</sup> microesferas.
- 9.13** Deje incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en el agitador tipo Rocker a ~15-30 rpm .
- 9.14** Luego centrifugue la solución a 13,200 rpm durante 5 min y descarte el sobrenadante como se indicó en 9.1.4-9.1.5.
- 9.15** Agregue 200 µl de buffer de fosfato de sodio 1% (v/v) y mezcle con agitador Vortex durante 10 s. Seguido centrifugue 5 min a 13,200 rpm y remueva el sobrenadante.
- 9.16** Agregue 200 µl de buffer de fosfato de sodio con 1% (p/v) de BSA al tubo A. Luego mezcle con agitador Vortex durante 15 s e incube a temperatura ambiente durante 30 min con agitador tipo Rocker en su mínima velocidad.
- 9.13** Centrifugue a 13,200 rpm durante 5 min y descarte el sobrenadante en un contenedor identificado como se describe en 9.1.4-9.1.5. Al nuevo pellet agréguele 200 µl de buffer de acoplamiento. Re suspenda las perlas mediante inversión del tubo cónico y centrifugue por 5 min a 13,200 rpm, para luego descartar el sobrenadante.
- 9.14** *Para guardar las microesferas acopladas:* re-suspenda el pellet de perlas acopladas en 1500 µl de buffer de acoplamiento (que contenga 200 ug/ml de solución de inhibidores de

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.02</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Acoplamiento de antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i> a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

proteasas). Proteja el tubo de la luz envolviendo el tubo A con papel aluminio y almacene a 4°C hasta el momento de su uso.

**10. Cálculos:**

**10.1** Para calcular el volumen de stock de microesferas a utilizar

$$\text{Volumen de stock necesario} = \frac{(\# \text{ de microesferas a acoplar})}{(\text{concentración del vial de stock})}$$

**10.2** Para calcular las diluciones de reactivos

$$(\text{Volumen inicial})(\text{Concentración inicial}) = (\text{Volumen final})(\text{Concentración final})$$

**10.3** Para calcular el porcentaje peso volumen

$$\frac{(\text{g de soluto})}{(\text{ml de la solución})} * 100$$

**11. Control de calidad:**

**11.1** Confirmar el acoplamiento de las perlas, para ello dirigirse al PNO 6.3: Verificación del acoplamiento de perlas.

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

**12.1** En el cuaderno de laboratorio correspondiente anotar:

Fecha y nombre del responsable.


Detalle de los reactivos utilizados, colocando la marca, número de catálogo y concentración de la solución madre.

Detalle de la preparación de las soluciones.


Cualquier procedimiento que se realizó y no está descrito en el presente PNO.

Cualquier observación que pudiera ser relevante para explicar los resultados.

A.4 Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b> <b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento normado de operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.03</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b></p>
	<p><b>Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>

1. **Propósito:** Verificar que el acoplamiento de los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33 a las microesferas xMAP® se haya realizado con éxito, y que durante el proceso se mantuvo la estructura y capacidad de acoplamiento del antígeno. Este proceso se llevaba a cabo previo a iniciar un ensayo multiplex con las perlas, para eliminar la probabilidad de un falso negativo debido a un acoplamiento incorrecto del antígeno.
2. **Aplicación:** Confirmación del acoplamiento correcto para su uso en estudios epidemiológicos de oncocercosis en el país.
3. **Referencias:**
  - 3.1 Luminex. (2018). *xMAP Cookbook* (3rd ed.). Luminex. <https://www.luminexcorp.com/blog/new-alternative-coupling-problematic-proteins-luminex-xmap-microspheres/downloadxmapcookbook/>
  - 3.2 Luminex®. (2011). Coupling Assessment. In *xMAP® Antibody Coupling Kit User Manual* (Issue 4, pp. 14–16). Luminex® Corporation. <https://www.ld.ru/w/multiplex/manual/abc.pdf>
4. **Terminología y abreviaturas:**
  - 4.1 s: segundos
  - 4.2 min: minutos
  - 4.3 mL: mililitro
  - 4.4 µL: microlitro
  - 4.5 µg: microgramos
  - 4.6 PBS: solución amortiguadora de fosfatos
  - 4.7 PE: ficoeritrina
  - 4.8 BSA: albúmina de suero bovino
  - 4.9 MFI: intensidad media fluorescente
  - 4.10 *O. volvulus* : *Onchocerca volvulus*

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.03</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

- 4.11 OV16: Antígeno recombinante de 16 aminoácidos específico de *O. volvulus*
- 4.12 OV17: Antígeno recombinante de 17 aminoácidos específico de *O. volvulus*
- 4.13 OV33: Antígeno recombinante de 33 aminoácidos específico de *O. volvulus*

5. **Principio:** Las microesferas acopladas con el antígeno recombinante OV16 pueden reaccionar y unirse a un anticuerpo específico marcado con ficoeritrina (PE). Este complejo luego se puede analizar en un instrumento Luminex® xMAP®. Y la intensidad de la fluorescencia emitida por la reacción indicará el acoplamiento de las perlas se realizó de manera exitosa.

6. **Documentos asociados:**


- 6.1 PNO 6.01: Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®
- 6.2 PNO 6.02 : Acoplamiento del antígeno OV16 de *Onchocerca volvulus* a las microesferas

7. **Seguridad:**

- 7.1 Utilizar bata de laboratorio y guantes durante todo el procedimiento
- 7.2 Los materiales descartables deben de estar limpios y previamente esterilizados por autoclave
- 7.3 Desinfectar todas las áreas de trabajo antes y después del trabajo con etanol al 70% (v/v)
- 7.4 Descartar de manera adecuada todos los materiales desechables dentro del basurero indicado para materiales plásticos.

8. **Equipos, materiales y reactivos:**


- 8.1 Equipo Luminex® MAGPIX® (16047702)
- 8.2 Microesferas xMAP® acopladas con antígeno OV16, OV17 y OV33
- 8.3 Micropipeta de 20 a 200µl
- 8.4 Punta de 20 a 200µl estériles
- 8.5 Micropipeta multicanal 20 a 200µl
- 8.6 Marcador indeleble

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.03</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

- 8.7 Descarte de puntas
- 8.8 Placa de ensayo de 96 pozos (Millipore® MultiScreen)
- 8.9 Gradilla para microtubos 1.5ml
- 8.10 Servilletas de papel absorbente
- 8.11 Agitador de placas tipo Roker
- 8.12 PBS 1X (Agua destilada 800ml, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g; pH 7.2)
- 8.13 PE
- 8.14 BSA
- 8.15 Scepter® 2.0 Cell Counter
- 8.16 Agua destilada y desionizada grado biología molecular
- 8.17 Separador magnético

## 9. Procedimiento:


- 9.1 Resuspenda las microesferas ya acopladas con el antígeno OV16, OV17 y OV33 usando agitador Vortex y sométalas a sonicación por 20 s
- 9.2 Prepare la mezcla de microesferas diluyendo el stock en PBS 1X hasta alcanzar una concentración final de 50 microesferas/ µl.
  - 9.2.1 *Uso de Scepter® 2.0 Cell Counter para alcanzar 50 microesferas/µl*
    - 9.2.1.1 Encienda el Scepter® para esto presione el interruptor que se encuentra en la parte posterior del instrumento.
    - 9.2.1.2 Una vez encendido deberá conectar el sensor; en pantalla aparecerán las instrucciones (detalladas) para cada paso del proceso de conteo.
    - 9.2.1.3 Brevemente presione el émbolo y sumerja la punta en tubo con el stock. Luego retire su dedo del embolo para extraer 50 µl de la suspensión de perlas
    - 9.2.1.4 El sensor calculará la concentración de perlas en el volumen extraído. Con este número podrá hacer las diluciones necesarias para alcanzar las 50 microesferas/µl
- 9.3 Prepare una solución de anticuerpo de detección de IgG4 anti-OV16, marcado con PE, a una concentración final de 4 µl/ml en buffer de ensayo (PBS, BSA 1% (p/v)). Repita esto para los demás antígenos.

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.03</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

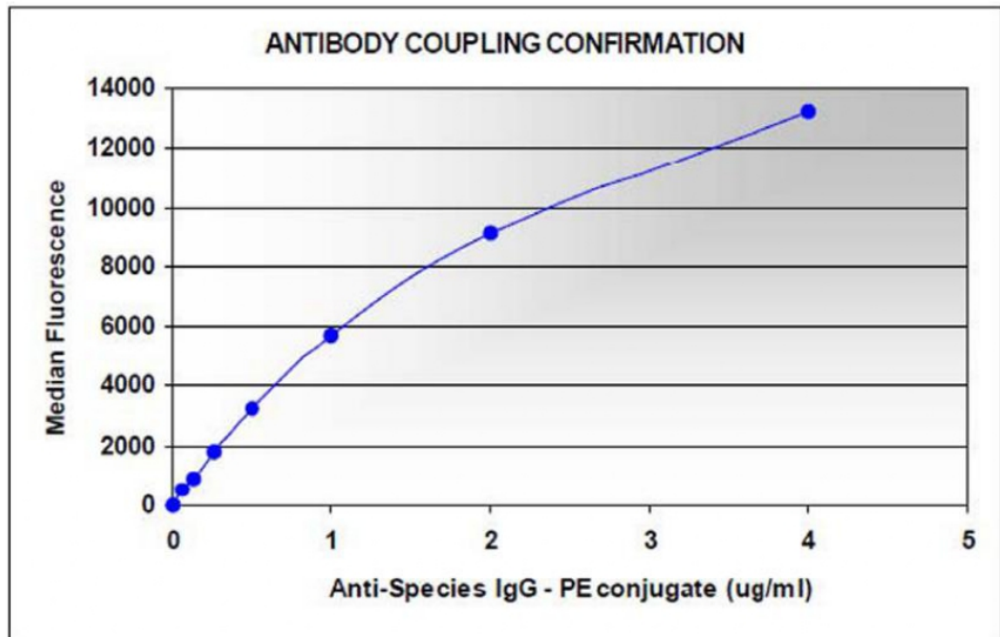
- 9.4** Prepare una dilución seriada 1:2 de la solución de anticuerpo de detección, esto hasta alcanzar una concentración de 0.0625 µg/mL
- 9.5** En las primeras dos columnas (1 y 2) de una placa de 96 pozos, coloque alícuotas de 50 µL de la solución preparada en el paso 9.2. El total de pocillos llenos deberá ser de 16.
- 9.6** Agregue 50 µL de buffer de ensayo en los pocillos A1 y A2, estos servirán como blanco en la verificación.
- 9.7** Agregue 50 µL de la solución preparada en el paso 9.4 a cada uno de los pocillos restantes, exceptuando los que posean el blanco, así como se muestra en el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco										
B	1:64	1:64										
C	1:32	1:32										
D	1:16	1:16										
E	1:8	1:8										
F	1:4	1:4										
G	1:12	1:12										
H	1:1	1:1										

- 9.8** Mezcle por pipeteo cada una de las reacciones con la pipeta multicanal de 200 µL. Luego cubra la placa y déjela incubar durante 30 min a temperatura ambiente en un agitador de placas tipo Rocker.
- 9.9** *Después de la incubación*
- 9.9.1 Coloque la placa en un separador magnético por 1-2 min.
- 9.9.2 Estando en el separador magnético retire el líquido de los pocillos utilizando una micropipeta multicanal de 20-200 µL. Luego lave cada uno de los pocillos con 100µL de buffer de ensayo, pipeteando varias veces, y por último vuelva a remover el líquido con una micropipeta multicanal. Hacer este procedimiento un total de dos veces.
- 9.10** Resuspensa las microesferas en 100µL de buffer de ensayo

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.03</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>


- 9.11** Analice 50-75µL de la suspensión en el Luminex®, siguiendo los pasos indicados en el PNO 6.04 . Se espera tener señales > 2000 y obtener una gráfica similar a la que se muestra a continuación:



**10. Cálculos:**

- 10.1** Para calcular porcentaje peso volumen

$$\frac{(g \text{ de soluto})}{ml \text{ de la solución}} * 100$$

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento normado de operación</b>	<b>PNO: 6.03</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha:</b>
	<b>Verificación del acoplamiento de los antígenos OV16, OV17, OV33 a las microesferas xMAP®</b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>


**11. Control de calidad:**

- 11.1** El único pozo que no deberá reportar MFI es en el pozo del blanco. En dado caso este reporte alguna señal se deberá repetir todo el proceso de verificación.
- 11.2** Se esperaría observar una relación directamente proporcional entre la señal emitida y la proteína acoplada en la superficie de la microesferas..

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

- 12.1** Mantener un registro de los resultados obtenidos al realizar la curva. Esto puede hacerlo utilizando el cuaderno de laboratorio respectivo para la prueba multiplex para Oncocercosis.

A.5 Ensayo múltiple para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de *O. volvulus*

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.04</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Ensayo múltiple para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado por:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>

1. **Propósito:** Determinar la respuesta de anticuerpos IgG e IgG4 a microesferas acopladas con los antígenos recombinantes OV16, OV17 y OV33, esto utilizando la tecnología Luminex® MAGPIX®.


2. **Aplicación:** Investigación sobre métodos para la vigilancia post-eliminación de la transmisión de la Onchocercosis.

3. **Referencias:**

- Luminex. (2018). *xMAP cookbook* (3rd ed.). Luminex. <https://www.luminexcorp.com/blog/new-alternative-coupling-problematic-proteins-luminex-xmap-microspheres/downloadxmapcookbook/>
- 3.1
- Feeser, K. R., Cama, V., Priest, J. W., Thiele, E. A., Wiegand, R. E., Lakwo, T., Feleke, S. M., & Cantey, P. T. (2017). Characterizing reactivity to *Onchocerca volvulus* antigens in multiplex bead assays. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 666–672. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0519>.
- 3.2
- Lobos, E., Weiss, N., Karam, M., Taylor, H., Ottesen, E. A., Nutman, T. (1991). An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen: a specific and early marker of infection. *Science*. 251(5001):1603-5.
- 3.3

4. **Terminología y abreviaturas:**

- 4.1  $\mu$ L: microlitro
- 4.2 ng:nanogramos
- 4.3 s:segundos
- 4.4 min: minutos
- 4.5 rpm: revoluciones por minuto
- 4.6 PBS: solución amortiguadora de fosfatos
- 4.7 TwPBS: : solución amortiguadora de fosfatos con Tween-20
- 4.8 SAPE: Estreptavidina conjugado con R-ficoeritrina
- 4.9 BSA: albúmina de suero bovino
- 4.10 *O. volvulus*: *Onchocerca volvulus*

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.04</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado por:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

5. **Principio:** Consiste en una técnica que evalúa hasta 50 analitos, de manera simultánea, utilizando un solo volumen de muestra. Para ello utiliza microesferas (perlas) de poliestireno codificadas por colores, cada una con 10 combinaciones diferentes de dos tintes fluorescentes. Es capaz de detectar desde citoquinas solubles, antígenos, anticuerpos hasta quimioquinas a través de citometría de flujo.

6. **Documentos asociados:**


- 6.1 PNO 6.01: Calibración y verificación del equipo Luminex® MAGPIX®
- 6.2 PNO 6.02: Acoplamiento de antígenos recombinantes de *O. volvulus* antígeno a las microesferas xMAP®

7. **Seguridad:**

- 7.1 Utilizar bata de laboratorio y guantes durante todo el procedimiento
- 7.2 Los materiales descartables deben de estar limpios y previamente esterilizados por autoclave
- 7.3 Desinfectar todas las áreas antes y después del trabajo con etanol al 70% (v/v)
- 7.4 Descartar de manera adecuada todos los materiales desechables dentro del basurero indicado para materiales plásticos y las soluciones en los contenedores designados

8. **Equipos, materiales y reactivos:**


- 8.1 Microesferas xMAP® acopladas con antígeno OV16, OV17 y OV33
- 8.2 TwPBS (PBS 1X con 0.05% Tween-20)
- 8.3 PBS 1X (Agua destilada 800ml, NaCl 8 g, KCl 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g; pH 7.2)
- 8.4 Agua destilada
- 8.5 IgG anti-humano de ratón biotilado
- 8.6 Buffer de ensayo (PBS 1X 1L, BSA 5.0g, NaN<sub>3</sub> 20% 0.2ml, Tween-20 0.5ml)
- 8.7 SAPE
- 8.8 Papel aluminio
- 8.9 Micropipeta de 20 a 200 µL
- 8.10 Micropipeta de 100 a 1000 µL
- 8.11 Puntas de 20 a 200 µL , estériles
- 8.12 Puntas de 100 a 1000 µL, estériles

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.04</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado por:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>


- 8.13 Descarte de puntas
- 8.14 Agitador tipo Vortex
- 8.15 Servilletas de papel absorbente
- 8.16 Marcador indeleble
- 8.17 Gradilla para tubos cónicos de 1.5 mL
- 8.18 Etanol al 70% (v/v)
- 8.19 Placa de ensayo de 96 pozos (Millipore® MultiScreen)
- 8.20 Agitador de placas
- 8.21 Equipo Luminex® MAGPIX® (16047702)
- 8.22 Fluido de vaina xMAP®
- 8.23 Separador magnético

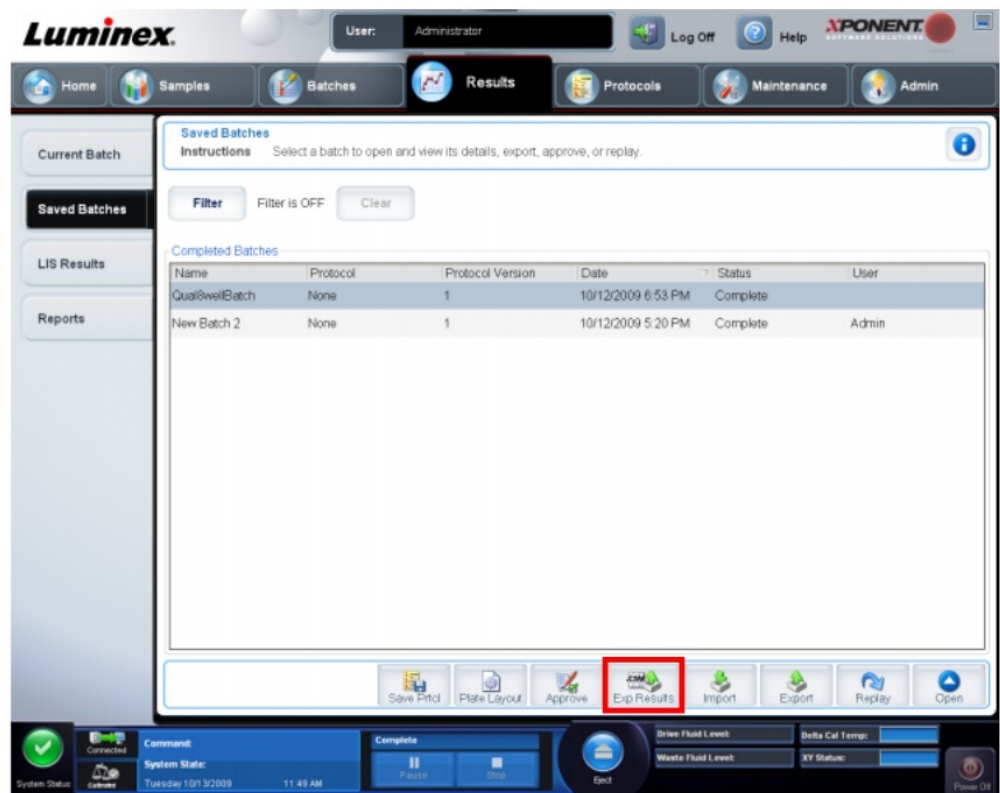
**9. Procedimiento:**

- 9.1 *Creación de un nuevo batch de ensayo Luminex® MAGPIX®*
  - 9.1.1 Pulse la pestaña de **Batches** y diríjase a la opción de **Create new Batch from an existing Protocol**
  - 9.1.3 Nombre la corrida con el nombre del kit que se utilizará o con el nombre acordado con el encargado de laboratorio
  - 9.1.4 Seleccione el protocolo específico para Oncocercosis y pulse **Next** (Ubicado en la esquina inferior derecha)
  - 9.1.5 Revise que la información del protocolo sea la correcta, en dado caso cambiara, modificalo.
  - 9.1.6 Pulse **Next**
  - 9.1.7 Edite la información de la placa según las condiciones de la corrida.
  - 9.1.8 Pulse **Next**
  - 9.1.7 Una vez terminados los pasos del 9.2-9.15 introduzca la placa al equipo y pulse **Run Batch**, ubicado en la esquina inferior derecha
- 9.2 *Ensayo múltiplex* Humedezca cada pozo de la placa con 100 µL de TwPBS y luego descarte el líquido. Paralelo, re suspenda las microesferas acopladas utilizando un agitador tipo Vortex.
- 9.3 Agregue 50 µL por pozo de la mezcla de microesferas, seguido de dos lavados con 100 µL de TwPBS cada uno.
- 9.4 Coloque 50µL de la muestra en cada pozo (Las muestras de suero o plasma deberán estar diluidas en una relación 1:5). Proceda a recubrir la placa con papel aluminio y deje incubando durante 1.5 horas a temperatura ambiente sobre un el agitador de placas a 600 rpm.

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.04</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Ensayo múltiple para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado por:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

- 9.5** Deseche la solución por filtración al vacío o agitando la placa sobre una toalla de papel absorbente.
- 9.6** Coloque la placa sobre el separador magnético, por proximadamente 1-2 min. Luego lave los pozos tres veces, con 100 µL de TwPBS cada vez, y proceda a retirar el líquido al igual que lo hizo en el paso 9.4.
- 9.7** Agregue 50 µL de la mezcla de anticuerpo secundario (50 µL de buffer de ensayo, 50 ng de IgG de ratón anti-humano biotinilado o 40 ng de IgG4 ratón anti-humano biotinilado)
- 9.8** Selle la placa con su tapadera y recubra con papel aluminio. Luego colóquela en el agitador de placas a 800 rpm durante 30 s.
- 9.9** Disminuya la velocidad hasta llegar a 600 rpm y deje incubando a temperatura ambiente durante 45 min.
- 9.10** Agite la placa para descartar la solución de los pocillos y repita el lavado con 100 µL por pozo de TwPBS
- 9.11** Agregue 50 µL del buffer de ensayo con 250 ng de SAPE a cada pocillo. Selle la placa con la tapadera y recubra con papel aluminio
- 9.12** Coloque la placa sobre el agitador de placas y repita el procedimiento del paso 9.8.
- 9.13** Agite la placa sobre una toalla de papel y lave los pocillos con 100 µL por pozo de TwPBS. No olvide colocar sobre el separador magnético.
- 9.14** Agregue 100 µL por pozo de PBS (pH 7.2), selle la placa y se recubra con papel aluminio. Coloque en el agitador Vortex y vaya aumentando la velocidad gradualmente, una vez este en el máximo deje allí por 30s.
- 9.15** Remueva la placa y colóquela inmediatamente en el equipo multiplex para realizar la lectura.
- 9.16** *Exportación de resultados*
- 9.15.1. Diríjase a la página de resultados, seleccione la pestaña de “Saved Batches” o “Lotes guardados”. Dentro de esta pestaña busque la corrida que acaba de realizar y selecciónela.
- 9.15.2. En la parte inferior del programa busque la opción de “Exp Results” y presione el botón izquierdo del *mouse*. Elija la carpeta en la que guardará el documento e identifique el documento con el nombre del estudio.
- 9.15.3. Presione el botón izquierdo del *mouse* en la opción de “aceptar” y espere a que el documento se guarde en formato .xlsx. Verifique que el documento se guardó de manera correcta abriendo el archivo desde la carpeta seleccionada.

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.04</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Ensayo múltiple para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 6</b></p> <p><b>Autorizado por:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b></p>




**10. Cálculos:**

**10.1** No aplica

**11. Control de calidad:**


- 11.1** El control positivo podrá ser suero que ha sido confirmado previamente como positivo mediante pruebas inmunológicas.
- 11.2** En cada corrida se debe incluir un control positivo, uno negativo y el buffer que se utilice como blanco. En el control negativo se espera obtener un MFI de 0, del control positivo se espera un MFI >2000.

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.04</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 6</b>  <b>Autorizado por:</b> <b>Preparado por:</b> <b>Estefani Quesada</b>

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

- 12.1 Guardar la corrida y los datos obtenidos en el servidor. Colocar un nombre que identifique el proyecto y la fecha en que se realizó el ensayo.

A.6 Análisis e interpretación de resultados del ensayo múltiple para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de *O. volvulus*

<p><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo múltiple para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b></p> <p><b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

1. **Propósito:** Interpretar de los datos obtenidos del ensayo múltiple con los antígenos recombinantes OV16, OV17 y O33 acopladas a las microesferas para determinar si hay presencia de anticuerpos IgG e IgG4 en la muestra.

2. **Aplicación:** Analizar e interpretar los datos obtenidos de una corrida múltiple en donde se evaluó la presencia o ausencia de anticuerpos IgG e IgG4 de *O. volvulus*.

3. **Referencias:**

Brian, A., Venables, B., Bates, D. M., Firth, D., & Ripley, M. B. (2020). *MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS* (R package 7.3-53). <https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/MASS.pdf>

3.1 Dag, O. (2019). *onewaytests: One-Way Tests in Independent Groups Designs* (R package 2.4). <https://cran.r-project.org/web/packages/userfriendlyscience/userfriendlyscience.pdf>

3.2 Derek, A., & Wheeler, P. (2020). *FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods* (R package 0.8.30). <https://cran.r-project.org/web/packages/FSA/FSA.pdf>

3.3 Feeser, K. R., Cama, V., Priest, J. W., Thiele, E. A., Wiegand, R. E., Lakwo, T., Feleke, S. M., & Cantey, P. T. (2017). Characterizing Reactivity to *Onchocerca volvulus* Antigens in Multiplex Bead Assays. *He American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 666–672. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0519>

3.4 Hope, R. M. (2016). *Rmisc: Ryan Miscellaneous* (R package 1.5). <https://cran.r-project.org/web/packages/Rmisc/Rmisc.pdf>

3.6 John, A., Weisberg, S., Price, B., Adler, D., Bates, D., Baud-bovy, G., Bolker, B., Ellison, S., Graves, S., Krivitsky, P., Laboissiere, R., Maechler, M., Monette, G., Murdoch, D., Ogle, D., Ripley, B., Venables, W., Walker, S., & Winsemius, D. (2020). *car: Companion to Applied Regression* (R package 3.0-9). <https://cran.r-project.org/web/packages/car/car.pdf>


3.7 Nunes, T., Heuer, C., Marshall, J., Sanchez, J., Thorn-, R., Reiczigel, J., Robison-cox, J., Sebastiani, P., Solymos, P., Yoshida, K., Pirikahu, S., Firestone, S., Kyle, R., Jay, M., Reynard, C., & Stevenson, M. M. (2020). *epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data* (R package 1.0-15). <https://cran.r-project.org/web/packages/epiR/epiR.pdf>

3.8 Peters, G.-J., Verboon, P., & Green, J. (2018). *userfriendlyscience: Quantitative Analysis Made Accessible* (R package 0.7.2). <https://cran.r-project.org/web/packages/userfriendlyscience/userfriendlyscience.pdf>

3.9 Tobias, A., Sander, O., & Beerenwinkel, N. (2020). *ROCR: Visualizing the Performance of Scoring Classifiers* (R package 1.0-11). <https://cran.r-project.org/web/packages/ROCR/ROCR.pdf>

3.9 Wickham, H. (2019). *stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations*. (R package 1.4.0). <https://cran.r-project.org/web/packages/stringr/stringr.pdf>

3.10

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

- 3.11 Wickham, H., Bryan, J., Kalicinski, M., Valery, K., Leitiene, C., Colbert, B., Hoerl, D., & Miller, E. (2019). *readxl: Read Excel Files* (R package 1.3.1). <https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/readxl.pdf>
- 3.12 Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., & Dunnington, D. (2020). *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (R package 3.3.2). <https://cran.r-project.org/package=ggplot2/ggplot2.pdf>
- 3.13 Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2020). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* (R package 1.0.2).

#### 4. Terminología y abreviaturas:

- 4.1 GST : glutation S-transferasa
- 4.2 MFI: intensidad media fluorescente
- 4.3 ROC: Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating Characteristic)
- 4.4 AUC: área debajo de la curva (Area Under the Curve)
- 4.5 IC: intervalo de confianza
- 4.6 *O. volvulus*: *Onchocerca volvulus*
- 4.7 núm: número
- 4.8 Las palabras en **negrita** harán referencia a comandos específicos.


#### 5. Principio:

Un algoritmo de programación permite el análisis un conjunto de datos “inputs” de manera automatizada para obtener resultados “outputs”, esto lo hace al seguir una secuencia de pasos lógicos o comandos que son colocados por el investigador. Es un proceso definido, preciso y finito que lleva a obtener la solución de un problema.

Para ejemplificar el análisis se utilizarán solo los datos del ensayo para la determinación de anticuerpos IgG4 contra en antígeno recombinante OV16

#### 6. Documentos asociados:

- 6.1 PNO # 6.04: Ensayo múltiplex para la detección de anticuerpos IgG e IgG4 contra antígenos recombinantes de *O volvulus*.

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>


**7. Seguridad:**

- 7.1 Asegurarse que el computador esté conectado a una fuente de poder y que tenga clave de acceso para restringir el ingreso solo al personal autorizado.
- 7.2 Guardar todos los archivos en la carpeta del proyecto y realizar una copia de seguridad de la misma

**8. Equipos, materiales y reactivos:**

- 8.1 Computador

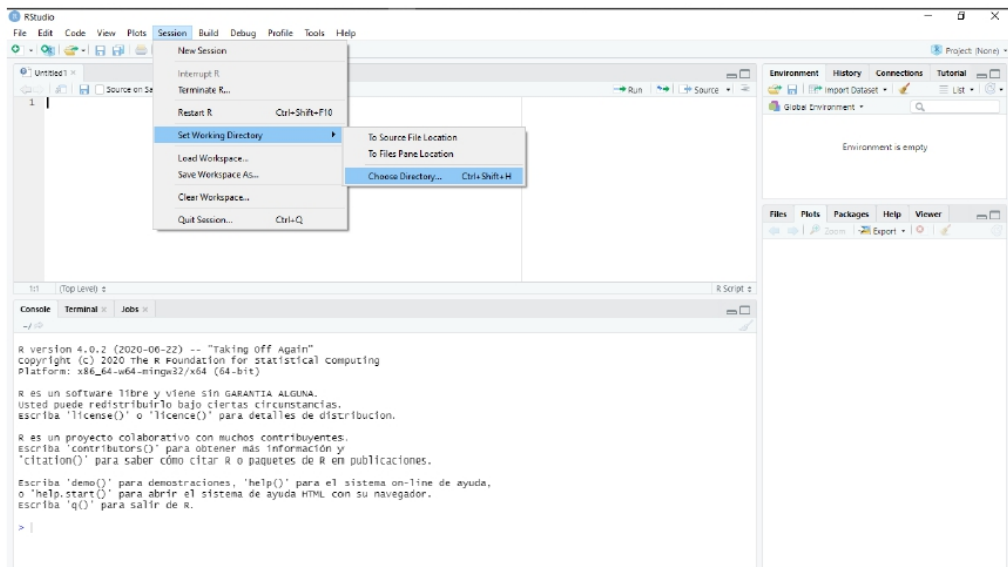
**9. Procedimiento:**

<p><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b></p> <p><b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

### 9.1 *Previo al análisis*

9.1.1. Asegurarse que el ordenador tenga instalado R y Rstudio. En dado caso no lo tenga descargue e instale ambos programas de las siguientes páginas: <https://cran.cnr.berkeley.edu/> y <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/#download>.

9.1.2. Inicie el programa Rstudio, dirijase a la ventanilla de *session* y elija la opción *Set working directory*. Esto definirá un directorio de trabajo que le permitirá cargar diferentes archivos a la interfaz.




9.1.3. Instale el paquete *Rmisc* utilizando el siguiente comando y presionando **Crt+Enter** para ejecutarlo:

```
1 install.packages("Rmisc")
```

Luego proceda a cargar cada uno de ellos a la interfaz utilizando el siguiente comando:

```
2 library(Rmisc)
```


**Crtl+Enter** servirá para ejecutar todos los comandos o instrucciones que coloquemos en nuestro algoritmo de R.

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

Instale y cargue los siguientes paquetes de la misma forma:

Paquete	Descripción
<i>readxl</i>	Este paquete permitirá importar archivos ‘.xls’ a la interfaz de R.
<i>dplyr</i>	Permite trabajar con dataframes (conjunto de datos) como si fueran objetos. Las funciones dentro del paquete permitirán filtrar, seleccionar, renombrar valores y/o columnas dentro del dataframe.
<i>MASS</i>	Posee funciones para realizar diferentes análisis estadísticos, importantes para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.
<i>ggplot2</i>	Este paquete es específico para crear diferentes tipos de gráficas y personalizar las mismas al gusto del investigador.
<i>ROCR</i>	Se utiliza para la creación de graficas ROC, calcular puntos de corte y AUCs.
<i>stringr</i>	Las funciones dentro de este paquete permiten preparar los datos antes de realizar el análisis de los mismos.
<i>car</i>	Este paquete debe de descargarse debido a que es un requisito para poder utilizar <i>MASS</i> , paralelo a esto permite realizar regresiones y gráficos.
<i>onewaytests</i>	Útil para realizar pruebas estadísticas como ANOVA, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U para dos muestras, normalidad entre otros.
<i>userfriendlyscience</i>	El objetivo del paquete es facilitarle el uso de funciones avanzadas a los nuevos usuarios de la interfaz de R.
<i>epiR</i>	Un paquete que permite realizar análisis de datos epidemiológicos.
<i>Rmisc</i>	Es un paquete que posee varias funciones útiles para el análisis de datos (ej. Intervalo de confianza) y operaciones de utilidad.
<i>pROC</i>	Este paquete, además de generar gráficos ROC, permite calcular los puntos de corte del modelo a través de diferentes métodos como el de Youden.

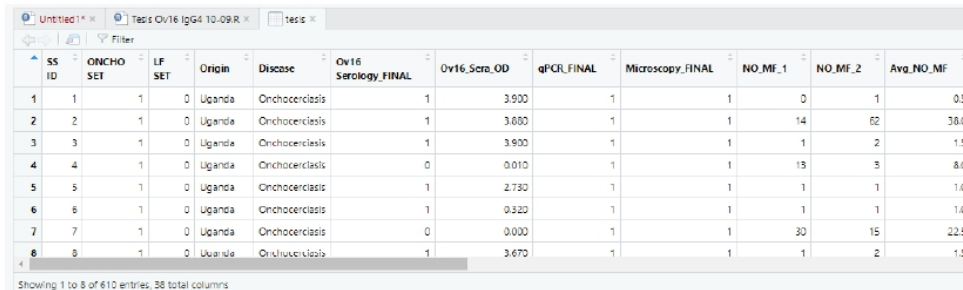
9.1.4. Exporte los resultados de la corrida en formato csv o xlsx (como se detalla en el PNO 6.04) y colóquelo en el directorio de trabajo que seleccionó en el paso 9.1.2. Recuerde guardar la sesión bajo un nombre que describa la naturaleza del análisis

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

**9.2** *Definir una variable* Cargue el archivo con los resultados a la interfaz de R utilizando el comando `read_excel()` o `read.csv()` acompañado del nombre del archivo. Paralelo a esto se le asignará un *dataframe*, lo cual se hace colocando un nombre cualquiera seguido de los símbolos <-


**9.3** El comando `View()` invoca una variable y permite verla en un estilo de hoja de cálculo. En este ejemplo el *dataframe* tendrá el nombre de “tesis”.

```
14
15 tesis <- read_excel("ROC MASTER_Final_VC_to_RM_EQ.xlsx")
16 view(tesis)
17 |
```



SS ID	ONCHO SET	LF SET	Origin	Disease	Ov16 Serology_FINAL	Ov16_Sera_OD	qPCR_FINAL	Microscopy_FINAL	NO_MF_1	NO_MF_2	Avg_NO_MF
1	1	1	Uganda	Onchocerciasis	1	3.900	1	1	0	1	0.5
2	2	1	Uganda	Onchocerciasis	1	3.600	1	1	14	62	36.0
3	3	1	Uganda	Onchocerciasis	1	3.900	1	1	1	2	1.5
4	4	1	Uganda	Onchocerciasis	0	0.010	1	1	13	3	8.0
5	5	1	Uganda	Onchocerciasis	1	2.730	1	1	1	1	1.0
6	6	1	Uganda	Onchocerciasis	1	0.320	1	1	1	1	1.0
7	7	1	Uganda	Onchocerciasis	0	0.000	1	1	30	15	22.5
8	8	1	Uganda	Onchocerciasis	1	3.670	1	1	1	2	1.5

Utilice esta función para verificar que el archivo cargado fue el correcto y para familiarizarse con la variable recién formada.

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

#### 9.4 Eliminación de la señal de la proteína de fusión GST

9.4.1. Define una nueva variable en donde se encuentren únicamente las columnas de interés, esto se hace de la siguiente manera `nueva_variable <- variable_original [fila, columna]`.

9.4.2. Reste la señal proveniente de la proteína de fusión del antígeno recombinante GST a la señal MFI utilizando el siguiente comando: `nueva_variable[‘nombre_nuevacol’] = nueva_variable[‘col_Ov16’] - nueva_variable[‘col_GST’]`. Esto generará una nueva columna con el resultado de la substracción.

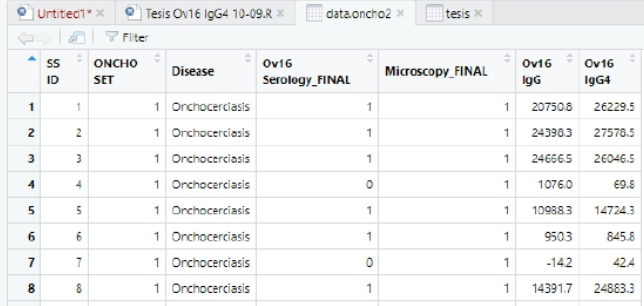
9.4.3. Define una nuevo *dataframe* con las columnas de interés excluyendo las columnas con los MFI originales. En este ejemplo los nuevos dataframes se llaman ‘Ov16 IgG’ y ‘Ov16 IgG4’.

```


18 #PARTE 0: Preparación de datos
19 #A) Eliminación de GST
20 data.oncho <- tesis[,c(1:6,9,13,20,26, 33)]
21 data.oncho[‘Ov16 IgG’] = data.oncho[‘Ov16_G’]-data.oncho[‘GST_G’]
22 data.oncho[‘Ov16 IgG4’] = data.oncho[‘Ov16_4’]-data.oncho[‘GST_4’]
23 data.oncho2 <- data.oncho[,c(1:2, 5:7, 12:13)]
24 view(data.oncho2)

```

#### 9.4.4. Utilice View() para observar su nuevo dataframe



SS ID	ONCHO SET	Disease	Ov16 Serology_FINAL	Microscopy_FINAL	Ov16 IgG	Ov16 IgG4
1	1	Onchocerciasis		1	20750.6	26229.5
2	2	Onchocerciasis		1	24398.3	27578.5
3	3	Onchocerciasis		1	24666.5	26046.5
4	4	Onchocerciasis		0	1076.0	69.8
5	5	Onchocerciasis		1	10988.3	14724.3
6	6	Onchocerciasis		1	950.3	845.6
7	7	Onchocerciasis		0	-14.2	42.4
8	8	Onchocerciasis		1	14391.7	24863.3

<p><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b></p> <p><b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

## 9.5 Curva ROC

9.5.1 Cree un objeto `prediction()` indicando las dos variables que desea que tenga la curva ROC, que es un diagrama gráfico que se utiliza para mostrar la capacidad de diagnóstico de los clasificadores binarios. En este ejemplo será la señal de IgG Ov16 y la columna que indica si fue o no positivo para oncocercosis, en este ejemplo conocida como ONCHO SET.

9.5.2 Luego cree un objeto `performance(prediction.obj, "tpr", "fpr")`, este comando realiza múltiples tipos de evaluaciones predictivas.


9.5.3. Grafique su curva ROC con la siguiente función `plot(performance.obj, colorize = T, main = "título del grafico")`. El argumento `colorize` es opcional, pues servirá para darle color al gráfico.

9.5.4. Agregue al gráfico una línea diagonal, para observar qué tan lejos o cerca se encuentra el gráfico de esta y hacer una inferencia de qué tan específico y sensible es su herramienta. Para esto utilice la función `abline(a = 0, b = 1)`

```

25
26     #B) Establecimiento de punto de corte
27     # I. Punto de corte para IgG4
28     #1. Curva de Característica Operativa del Receptor (ROC, por sus siglas en inglés
29 pred_IgG4 <- prediction(data.oncho2$'Ov16 IgG4', data.oncho2$'ONCHO SET')
30 perf_IgG4 <- performance(pred_IgG4, "tpr", "fpr")
31 plot(perf_IgG4,
32       colorize = T)
33 abline(a=0, b=1)
34

```

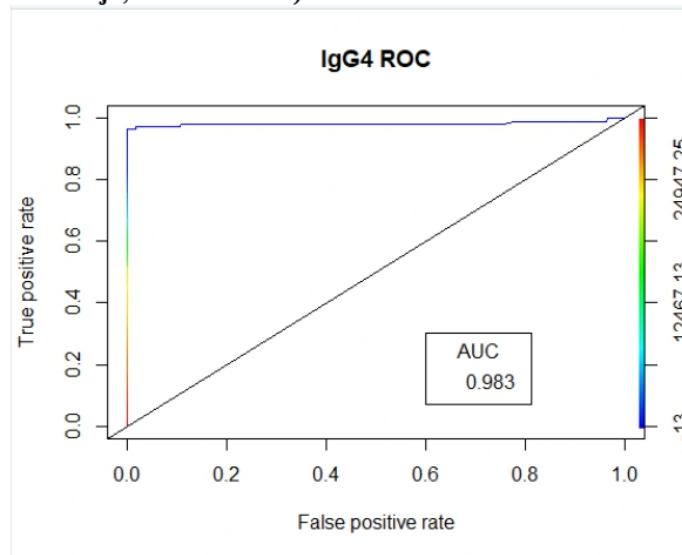
<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>


9.5.5 *Determinación de AUC* Cree un segundo objeto **performance(prediction.obj, “auc”)** utilizando el mismo objeto *prediction* creado en el paso 9.5.1. El argumento *auc* indica la precisión de la prueba diagnóstica, el rango de valores es de 0.5 (sin capacidad diagnóstica) – 1.0 (capacidad diagnóstica perfecta).

9.5.6 Visualice el valor de AUC con el siguiente comando **unlist(slot(performance.obj2, “y.values”))**. En este comando la función **slot(, “y.values”)** hará referencia a la lista de puntos del eje utilizados para hacer las predicciones, mientras que **unlist()** permite colocar estos valores y hacerlo en uno solo.

9.5.7 *Opcional* Redondee el valor obtenido a 4 dígitos utilizando el comando **round(performance.obj2, 4)**, el número puede variar de acuerdo a los parámetros del análisis.

Ahora coloque el AUC a la curva ROC con el siguiente comando **legend(x, y, performance.obj2, title = “AUC”)**



<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

## 9.6 Punto de corte

9.6.1. Cree un objeto **roc**(**respuesta**, **predicción**, **transponse**), el argumento *transpose* = *FALSE* . La “respuesta” es la columna codificada por 0(casos negativos) y 1 (casos positivos). Y nómbrelo *pto.corte*

9.6.2. Cree un *dataframe* cuyo nombre sea *cutoffs* con el comando **coords**(**pto.corte**, “**best**”, **ret= “threshold”**). El argumento *best* y *threshold* le indicarán al comando que devuelva el punto de corte más óptimo. Ejecútelo y el programa le devolverá el valor del punto de corte, que es el punto de donde los resultados de la prueba se dividen en diferentes categorías; típicamente positivo (indicando que alguien tiene la enfermedad o condición de interés) o negativo (indicando que alguien no tiene la enfermedad o condición de interés).

```
#2. Punto de corte
pto.corte_IgG4 <- roc(data.oncho2$'ONCHO SET', data.oncho2$'Ov16 IgG4', transpose = FALSE)
Cutoff_IgG4 <- coords(pto.corte_IgG4, "best", ret="threshold", transpose = FALSE)
Cutoff_IgG4


> Cutoff_IgG4
  threshold
1      40.75
```

## 9.7 Determinación del IC

Determine el intervalo de confianza de las señales de IgG anti OV16 con una probabilidad de 0.95 (95%), recomendado por Lumindex®, esto utilizando la función **ci.coords**(**x = “best”**, **input = “threshold”**, **conf.level = 0.95**). Un intervalo de confianza del 95% es un rango de valores del que se puede estar 95% seguro que contiene la media real de la población.

```
#3. Determinación del intervalo de confianza (IC)
#El IC servirá para determinar la fiabilidad del valor de corte.
Intervalo_confianza <- ci.coords(pto.corte_IgG4, x="best", input = "threshold", conf.level = 0.95)
Intervalo_confianza
```

Esto servirá para determinar la fiabilidad del punto de corte calculado en el paso anterior.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

- 9.8 *Opcional* Cree un nuevo *dataframe* específico, en el cual posea solo los valores provenientes de oncocercosis para ello utilice la función **filter()** esta le permitirá seleccionar todas las filas que cumplan con ciertas condiciones.

```

87 #PARTE 1: Tratamiento de datos de Oncocercosis
88 #A) Dataframe con datos solo de Oncocercosis
89 #1. Dataframe solo Onchocercosis
90 data.specific <- filter(data.oncho2, Disease == "onchocerciasis")
91 view(data.specific)
92

```

Utilice el operador == para indicar que criterio deben de cumplir las filas para ser incluidas en el nuevo *dataframe*.


- 9.9 Filtre su base de datos específica a partir del punto de corte, utilizando la función **filter()** y el operador > seguido del valor del punto de corte. Este comando hará que el nuevo *dataframe* solo contenga los valores arriba del punto de corte, es decir los verdaderos positivos de la prueba.

```

#2. Dataframe solo Onchocercosis filtrado a partir del pto de corte
#2.1 IGG4
Multiplex_Ov16 <- data.specific %>%
  filter(data.specific$`Ov16 Igg4` > 40.75)

```

El operador %>% permite concatenar múltiples operaciones del paquete *dplyr*, lo cual evitará que el usuario cree un comando desde cero.

<p><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b></p> <p><b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

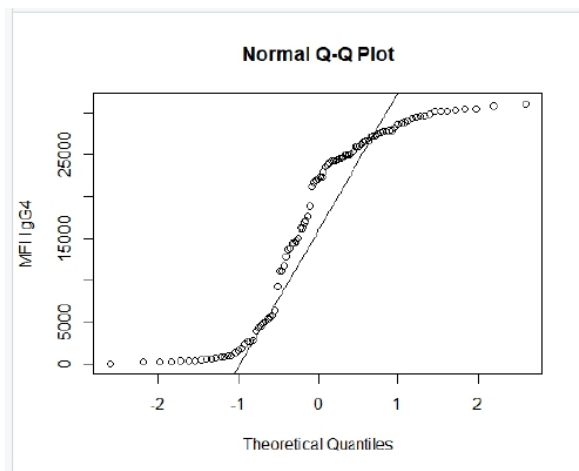
## 9.10 Gráficos

9.10.1. Cree un gráfico cuantil-cuantil (conocido como Q-Q) con los valores de MFI, en este ejemplo para anticuerpos IgG4 contra OV16, utilizando la función `qqnorm()` y agregue la línea de probabilidad con la función `qqline()`.

```

103 #C) Gráficos
104 #1. gráfico Q-Q IgG4
105 qqnorm(Multiplex_ov16$`Ov16 IgG4`, ylab= "MFI IgG4")
106 qqline(Multiplex_ov16$`Ov16 IgG4`, ylab= "MFI IgG4")
107

```




Este gráfico permite inferir si los datos analizados siguen una distribución normal, exponencial o de otro tipo.

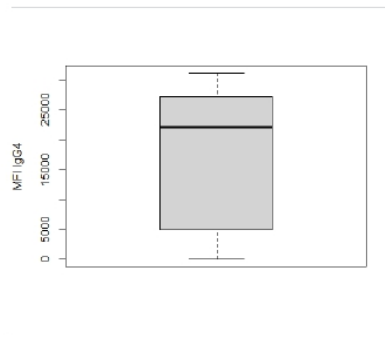
9.10.2. Cree un gráfico de caja y bigotes con los MFI, en este ejemplo, de la respuesta de anticuerpos IgG4 contra OV16, utilizando la función `boxplot()`. Este gráfico permite visualizar la dispersión y simetría de los valores de MFI, y compararlos entre sistemas antígeno-anticuerpo.

```

113 #2.2 Boxplot IgG4 Onchocercosis
114 boxplot(Multiplex_ov16$`Ov16 IgG4`, ylab= "MFI IgG4")
115


```

<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>



*Opcional* Cree un gráfico de caja y bigotes que compare los controles negativos contra los controles positivos, utilizando la función anterior de **boxplot()** y el comando que se muestra en la imagen de continuación:

```
Boxplot_todos <- boxplot(data.oncho2$`Ov16 IgG4` ~ data.oncho2$Disease, ylab = "MFI IgG4", xlab= "Enfermedad", las = 2)
abline(h= 43, col= "red" )
```

<p><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b></p> <p><b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

### 9.11 *Parámetros de validación*

Utilice los siguientes comandos para determinar la especificidad, sensibilidad y valor predictivo de la prueba diagnóstica

```

141
142 dat.multiplex <- as.table(matrix(c(104,0,5,501), nrow = 2, byrow = TRUE))
143 colnames(dat.multiplex) <- c("Dis+", "Dis-")
144 rownames(dat.multiplex) <- c("Test+", "Test-")
145 Multiplex_ov16_ss <- epi.tests(dat.multiplex, conf.level = 0.95)
146 print(Multiplex_ov16_ss)

```

9.11.1 Coloque en el comando **as.table(matrix(c(a,b,c,d), nrow = 2, byrow = TRUE))** donde:

a = núm. de resultados positivos con la prueba diagnóstica

b = Diferencia entre núm. de verdaderos negativos y núm. de resultados negativos con la prueba diagnóstica

c = Diferencia entre núm. de verdaderos positivos y núm. de resultados positivos con la prueba diagnóstica

d = núm. de resultados negativos con la prueba diagnóstica

9.11.2 Utilice la función **colnames()** y **rownames()** para colocar el nombre de las columnas y filas de la prueba, donde:

Dis+ = Disease positive

Dis- = Disease negative

9.11.3 Use la función **epi.test()** para calcular la sensibilidad, especificidad y valores predictivos (negativos y positivos) de la prueba diagnóstica.


9.11.4 Visualice los resultados utilizando la función **print()**, lo cual le devolverá la siguiente información:

```

> print(Multiplex_ov16_ss)
      Outcome + Outcome - Total
Test +         104         0    104
Test -          5        501    506
Total          109        501    610

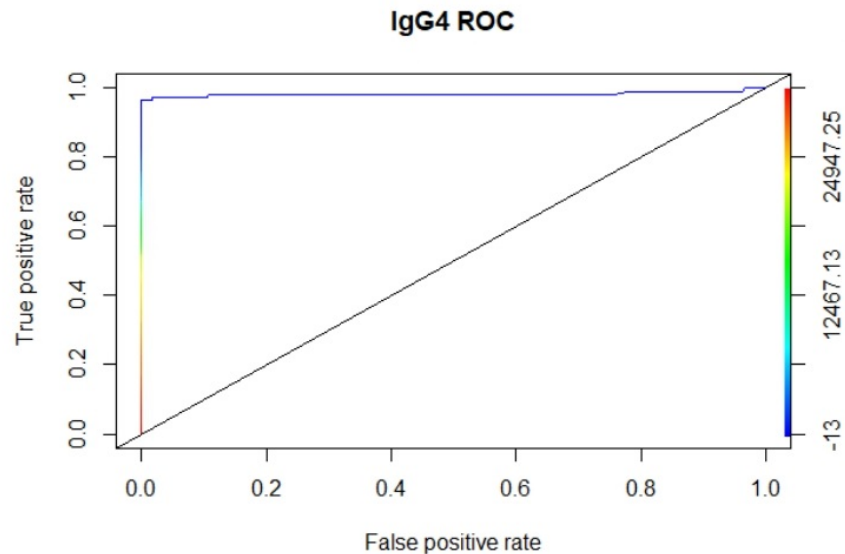
Point estimates and 95 % CIs:
-----
Apparent prevalence      0.17 (0.14, 0.20)
True prevalence         0.18 (0.15, 0.21)
Sensitivity              0.95 (0.90, 0.98)
Specificity              1.00 (0.99, 1.00)
Positive predictive value 1.00 (0.97, 1.00)
Negative predictive value 0.99 (0.98, 1.00)
Positive likelihood ratio Inf (NaN, Inf)
Negative likelihood ratio 0.05 (0.02, 0.11)
-----
>

```

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b>  	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

## 10. Cálculos:

- 10.1** Curva ROC: La curva ROC permite cuantificar que tan preciso una prueba o sistema de diagnóstico discrimina entre dos estados de pacientes, estos siendo “enfermo” y “no enfermo”. Cuando la curva se encuentra cercana a la línea diagonal refleja que la prueba o sistema es poco preciso.




- 10.2** AUC: El valor de AUC se encuentra entre 0.5 y 1, donde 0.5 denota un clasificador incorrecto y 1 denota un clasificador excelente. En este ejemplo,

```
> AUC_IgG4
[1] 0.983
```

- 10.3** Punto de corte

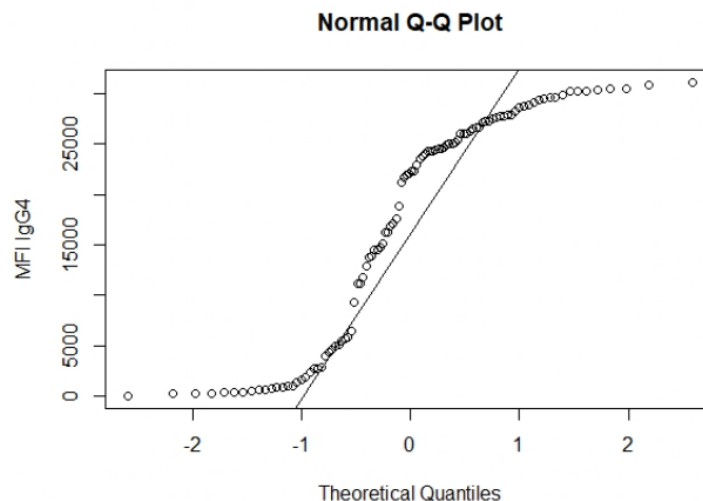
```
> Cutoff_IgG4
threshold
1      40.75
```


<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

- 10.4** Intervalo de confianza. Debe revisarse si el intervalo de confianza incluye el valor de la media. Si un intervalo de confianza no incluye el valor de la media, es probable que este valor no sea la media real de la población.

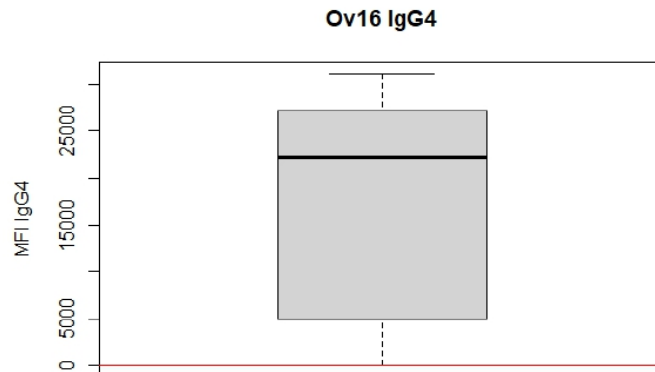
```
> Intervalo_confianza
95% CI (2000 stratified bootstrap replicates):
threshold threshold.low threshold.median threshold.high :
best      best          12.3          40.75          151.2
```

- 10.5** Gráfico Q-Q. Permite determinar el tipo de distribución de los datos de MFI y la simetría y curtosis de dicha distribución. Si los puntos trazados en el gráfico se encuentran formando una línea recta, puede decirse que la distribución es normal. Si el extremo inferior de la gráfica Q-Q se desvía de la línea recta pero el extremo superior no, entonces la distribución está sesgada hacia la izquierda (negativamente) pero si el extremo superior del gráfico Q-Q se desvía de la línea recta pero el inferior no, entonces la distribución está sesgada a la derecha (o sesgada positivamente). En cuanto a la curtosis, si ambos extremos de la gráfica Q-Q se desvían de la línea recta y su centro es recto, tenemos una distribución con una cola gruesa. Una distribución de cola delgada formará una gráfica Q-Q con una desviación muy pequeña o insignificante en los extremos.



<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>


**10.6** Gráfico de caja y bigotes. Da una idea del nivel de acuerdo entre los datos. La mediana es la que se muestra en el centro del cuadro. El rango indica la distribución de los datos; la distancia entre el valor más pequeño y el valor más grande, incluidos los valores atípicos. Los bigotes superiores e inferiores representan puntos fuera del 50% de la muestra. Los bigotes generalmente se extienden sobre un rango más amplio que los grupos del cuartil medio.



**10.7** Parámetros de Validación

```
> print(Multiplex_Ov16_ss)
      Outcome +   Outcome -   Total
Test +         104           0       104
Test -           5         501       506
Total          109         501       610

Point estimates and 95 % CIs:
-----
Apparent prevalence          0.17 (0.14, 0.20)
True prevalence              0.18 (0.15, 0.21)
Sensitivity                   0.95 (0.90, 0.98)
Specificity                   1.00 (0.99, 1.00)
Positive predictive value     1.00 (0.97, 1.00)
Negative predictive value     0.99 (0.98, 1.00)
Positive likelihood ratio     Inf (NaN, Inf)
Negative likelihood ratio     0.05 (0.02, 0.11)
-----
```

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

**11. Control de calidad:**

- 11.1** En dado caso exista un error en la sintaxis del comando o con la función que se pretende utilizar R regresará mensajes de error. En la siguiente referencia se encuentran algunos de estos mensajes y que hacer en dado caso aparezcan:

ProgrammingR. (2020). *Common R Error Messages*. <https://www.programmingr.com/r-error-messages/>


- 11.2** Comparar los resultados obtenidos con los reportados en el artículo de Feeser y colaboradores (2017) , esto calculando el porcentaje de variación entre datos a través de la siguiente formula

$$\frac{|Valor\ obtenido\ con\ el\ algoritmo - valor\ reportado\ en\ el\ artículo|}{valor\ reportado\ en\ el\ artículo} * 100$$

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

- 12.1 Colocar el resultado en la base de datos del laboratorio, en la pestaña específica para el ensayo múltiplex de oncocercosis.

**13. Anexo:**


<p><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p>	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
<p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

### 13.1 Algoritmo completo del ejemplo utilizado en este POE:

```

1  install.packages("FSA")
2  library(Rmisc)
3  library(readxl)
4  library(dplyr)
5  library(MASS)
6  library(ggplot2)
7  library(ROCR)
8  library(stringr)
9  library(car)
10 library(onewaytests)
11 library(userfriendlyscience)
12 library(FSA)
13 library(epiR)
14 library(proc)
15
16 tesis <- read_excel("ROC MASTER_Final_VC_to_RM_EQ.xlsx")
17 View(tesis)
18
19 #PARTE 0: Preparación de datos
20 #A) Eliminación de GST utilizado como blanco
21 data.oncho <- tesis[c(1:6,9,13,20,26, 33)]
22 data.oncho[, 'ov16 IgG'] = data.oncho[, 'ov16_G'] - data.oncho[, 'GST_G']
23 data.oncho[, 'ov16 IgG4'] = data.oncho[, 'ov16_4'] - data.oncho[, 'GST_4']
24 data.oncho2 <- data.oncho[, c(1:2, 5:7, 12:13)]
25 View(data.oncho2)
26
27 #B) Establecimiento de punto de corte
28 # I. Punto de corte para IgG4
29 #1. Curva de Característica Operativa del Receptor (ROC, por sus siglas en inglés)
30 pred_IgG4 <- prediction(data.oncho2[, 'ov16 IgG4', data.oncho2[, 'ONCHO SET'])
31 perf_IgG4 <- performance(pred_IgG4, "tpr", "fpr")
32 plot(perf_IgG4,
33      colorize = T,
34      main = "Curva ROC para la detección de IgG4 Ov16",
35      xlab = "1-Especificidad",
36      ylab = "Sensibilidad",
37      print.cutoffs.at = 40.7)
38 abline(a=0, b=1)
39
40
41 #1.1 Determinación del área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés)
42 # Se espera que una buena curva ROC posea un AUC >0.7, pues indicará que el modelo
43 # utilizado tiene un buen poder diagnóstico.
44 AUC_IgG4 <- performance(pred_IgG4, "auc")
45 AUC_IgG4 <- unlist(slot(AUC_IgG4, "y.values"))
46 AUC_IgG4 <- round(AUC_IgG4, 4)
47 AUC_IgG4
48 legend(0.6, 0.3, AUC_IgG4, title = "AUC")
49
50 #2. Punto de corte
51 pto.corte_IgG4 <- roc(data.oncho2[, 'ONCHO SET', data.oncho2[, 'ov16 IgG4', transpose = FALSE)
52 cutoff_IgG4 <- coords(pto.corte_IgG4, "best", ret="threshold", transpose = FALSE)
53 cutoff_IgG4
54
55
56 #3. Determinación del intervalo de confianza (IC)
57 #El IC servirá para determinar la fiabilidad del valor de corte.
58 Intervalo_confianza <- ci.coords(pto.corte_IgG4, x="best", input = "threshold", conf.level = 0.95)
59 Intervalo_confianza
60
61 #II. PUNTO de corte para IgG
62 #1. ROC
63 pred_IgG <- prediction(data.oncho2[, 'ov16 IgG', data.oncho2[, 'ONCHO SET'])
64 perf_IgG <- performance(pred_IgG, "tpr", "fpr")
65 plot(perf_IgG,
66      colorize = T,
67      main = "Curva ROC para la detección de IgG Ov16",
68      xlab = "1-Especificidad",
69      ylab = "Sensibilidad",
70      print.cutoffs.at = 557)
71 abline(a=0, b=1)
72
73 #1.1 AUC
74 AUC_IgG <- performance(pred_IgG, "auc")
75 AUC_IgG <- unlist(slot(AUC_IgG, "y.values"))


```

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b></p>
	<p><b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b></p>	<p><b>Páginas Totales: 21</b></p> <p><b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b></p>

```

76 AUC_IgG <- round(AUC_IgG, 4)
77 AUC_IgG
78 legend(0.6, 0.3, AUC_IgG, title = "AUC")
79
80 #2. Punto de corte
81 pto.corte_IgG <- roc(data.oncho2$'ONCHO SET', data.oncho2$'ov16 IgG', transpose = FALSE)
82 Cutoff_IgG <- coords(pto.corte_IgG, "best", ret="threshold", transpose = FALSE)
83 cutoff_IgG
84
85 #3. IC
86 Intervalo_confianza_IgG <- ci.coords(pto.corte_IgG, x="best", input = "threshold", conf.level = 0.95)
87 Intervalo_confianza_IgG
88
89 #PARTE 1: Tratamiento de datos de Oncocercosis
90 #A) Dataframe con datos solo de oncocercosis
91 #1. Dataframe solo oncocercosis
92 data.specific <- filter(data.oncho2, Disease == "Oncocerciasis")
93 View(data.specific)
94
95 #2. Dataframe solo oncocercosis filtrado a partir del pto de corte
96 #2.1 IgG4
97 Multiplex_Ov16 <- data.specific %>%
98   filter(data.specific$'Ov16 IgG4' > 40.75)
99
100 #2.2 IgG
101 Multiplex_IgG_Ov16 <- data.specific %>%
102   filter(data.specific$'Ov16 IgG4' > 557)
103
104 #C) Gráficos
105 #1. Gráfico Q-Q IgG4
106 qqnorm(Multiplex_Ov16$'Ov16 IgG4', ylab= "MFI IgG4", main = "Gráfico Q-Q para IgG4")
107 qqline(Multiplex_Ov16$'Ov16 IgG4', ylab= "MFI IgG4")
108
109
110
111 #2. Boxplot
112 #2.1 Boxplot controles negativos y control positivo
113 boxplot_todos <- boxplot(data.oncho2$'Ov16 IgG4' ~ data.oncho2$Disease, ylab = "MFI IgG4", xlab= "Enfermedad", la
114 abline(h= 43, col= "Red" )
115
116 #2.2 Boxplot IgG4 Oncocercosis
117 boxplot(Multiplex_Ov16$'Ov16 IgG4', ylab= "MFI IgG4", main = "Detección de IgG4 Ov16")
118 abline(h= 43, col= "Red" )
119
120 #D) Parametros de validación
121 count(Multiplex_Ov16)
122
123 #1.1 Múltiplex IgG
124 dat.IgG <- as.table(matrix(c(97,0,12,501), nrow = 2, byrow = TRUE))
125 colnames(dat.IgG) <- c("Dis+", "Dis-")
126 rownames(dat.IgG) <- c("Test+", "Test-")
127 IgG_Ov16_ss <- epi.tests(dat.IgG, conf.level = 0.95)
128 print(IgG_Ov16_ss)
129
130 #1.2 ELISA Ov16
131 ELISA_Ov16 <- data.specific %>%
132   filter('Ov16 Serology_FINAL' == "1")
133 count(ELISA_Ov16)
134
135 dat.ELISA0v16 <- as.table(matrix(c(102,0,7,501), nrow = 2, byrow = TRUE))
136 colnames(dat.ELISA0v16) <- c("Dis+", "Dis-")
137 rownames(dat.ELISA0v16) <- c("Test+", "Test-")
138 ELISA_Ov16_ss <- epi.tests(dat.ELISA0v16, conf.level = 0.95)
139 print(ELISA_Ov16_ss)
140
141
142 #1.3 Múltiplex IgG4
143 dat.multiplex <- as.table(matrix(c(105,0,4,501), nrow = 2, byrow = TRUE))
144 colnames(dat.multiplex) <- c("Dis+", "Dis-")
145 rownames(dat.multiplex) <- c("Test+", "Test-")
146 Multiplex_Ov16_ss <- epi.tests(dat.multiplex, conf.level = 0.95)
147 print(Multiplex_Ov16_ss)

```

<b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b>  <b>Laboratorio II2-304</b> 	<b>Procedimiento Normado de Operación</b>	<b>PNO: 6.05</b> <b>Versión: 1</b> <b>Fecha: 2020</b>
	<b>Análisis e interpretación de resultados del ensayo multiplex para la detección de anticuerpos IgG o IgG4 contra antígenos recombinantes de <i>O. volvulus</i></b>	<b>Páginas Totales: 21</b>  <b>Autorizado por</b> <b>Preparado por: Estefani Quesada</b>

**13.2** Archivo de los algoritmos utilizados



**Análisis de IgG e IgG4 OV16.R**



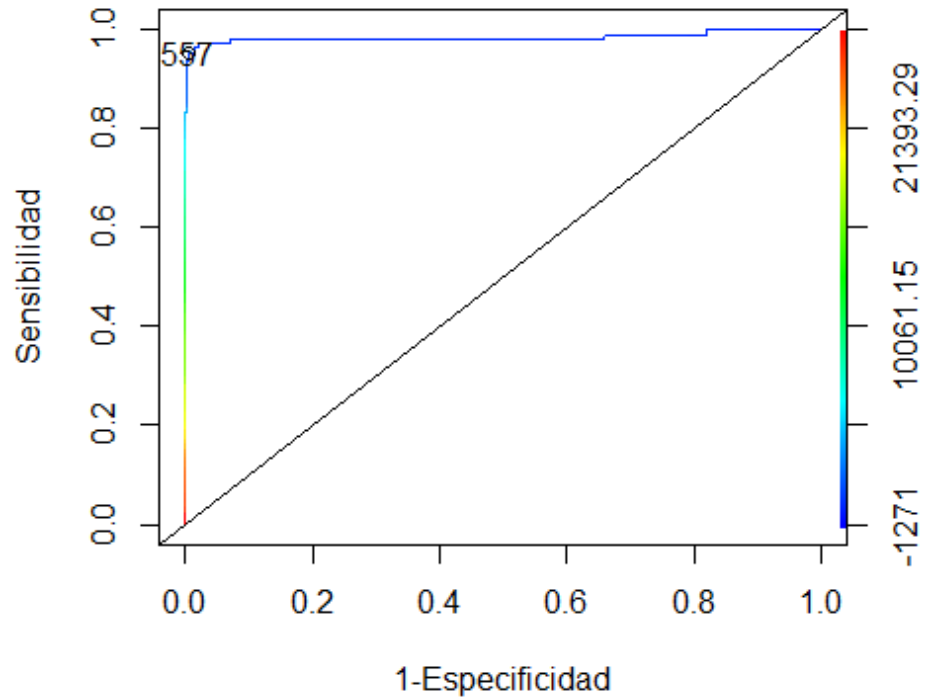
**Análisis de IgG e IgG4 OV16.R**



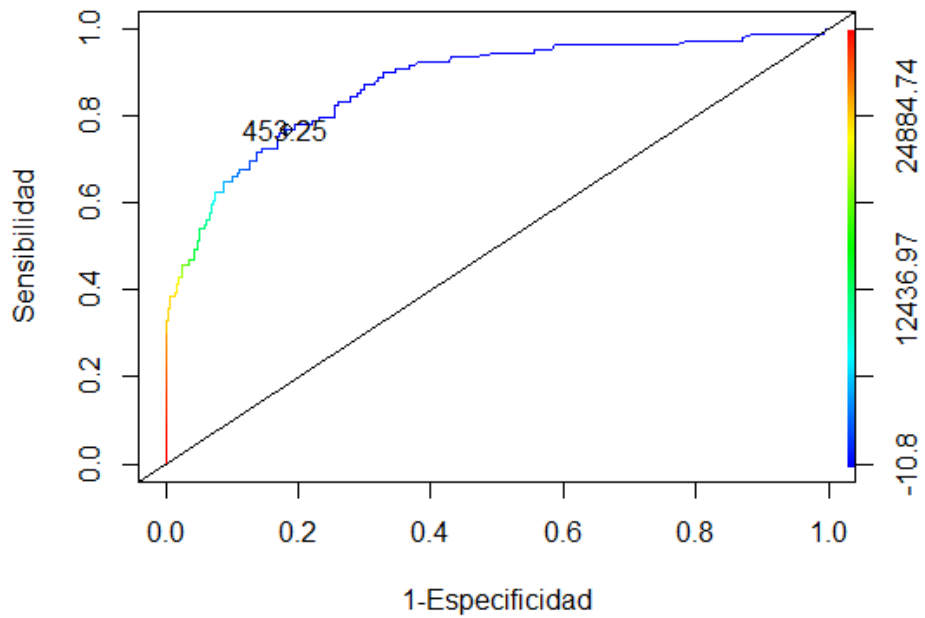
**Análisis de IgG e IgG4 OV33.R**

## B. Gráficos de R

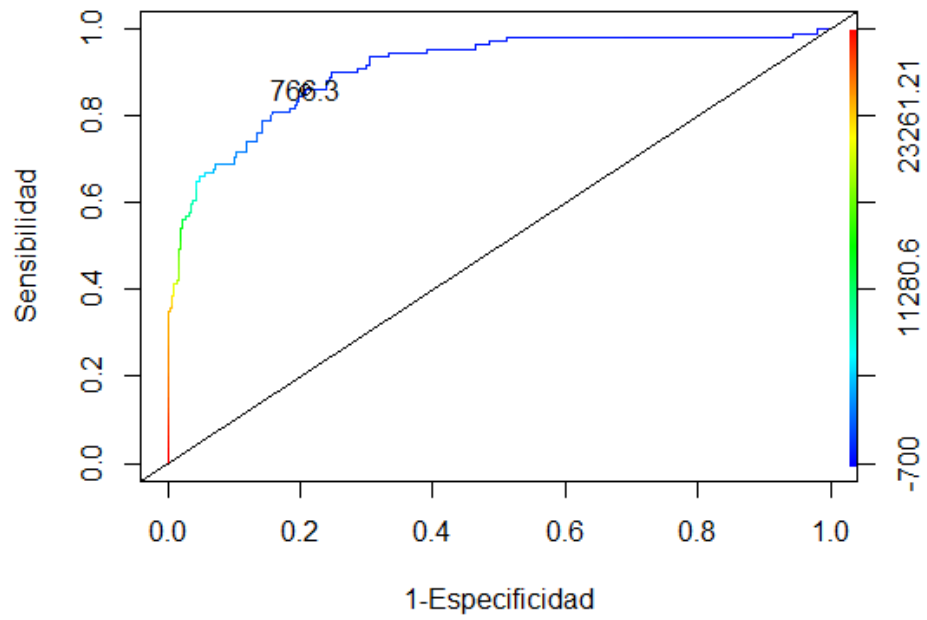
B.1 Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anticuerpos IgG con microesferas acopladas con OV16



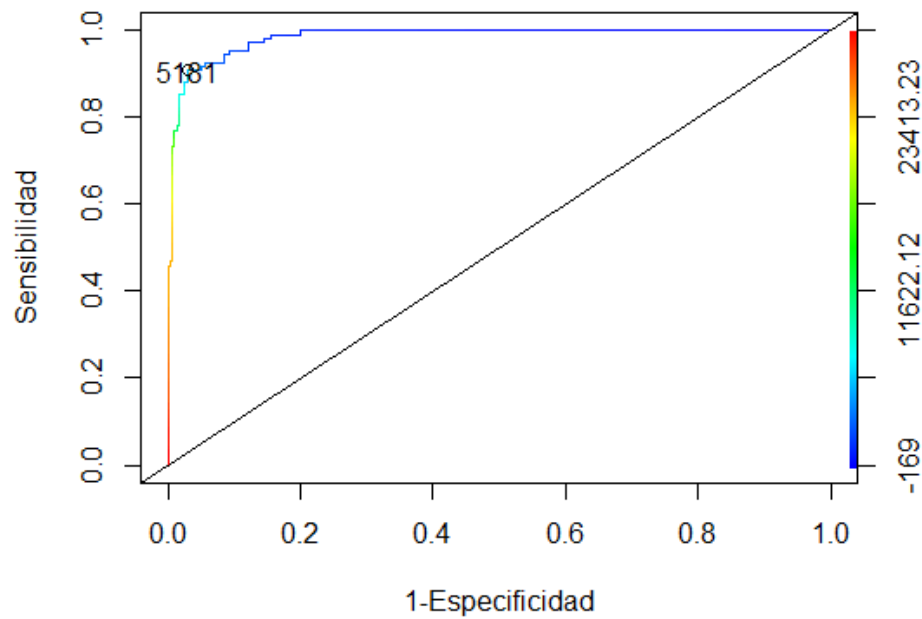
B.2 Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anticuerpos IgG4 con microesferas acopladas con OV17



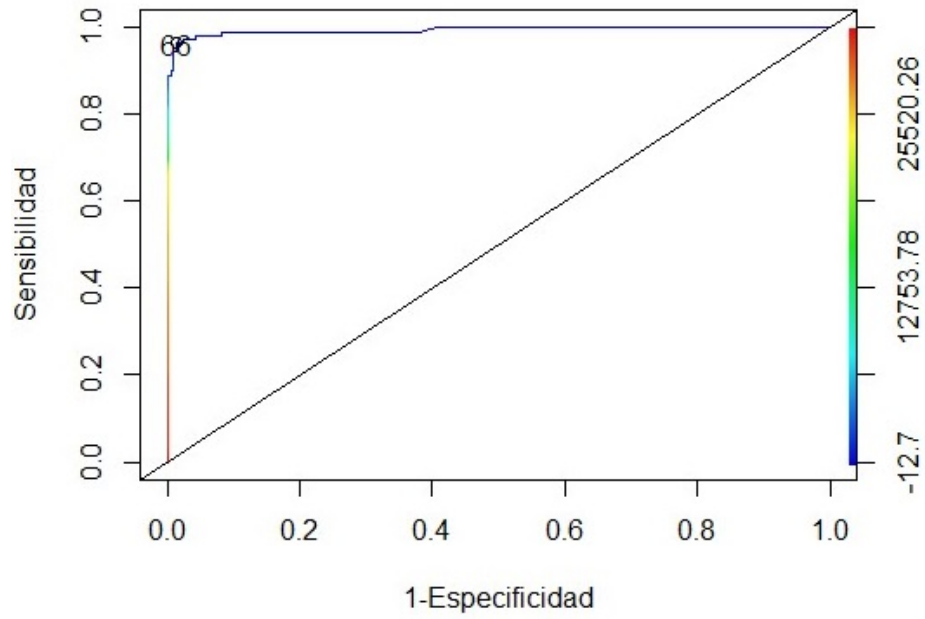
B.3 Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anticuerpos IgG con microesferas acopladas con OV17



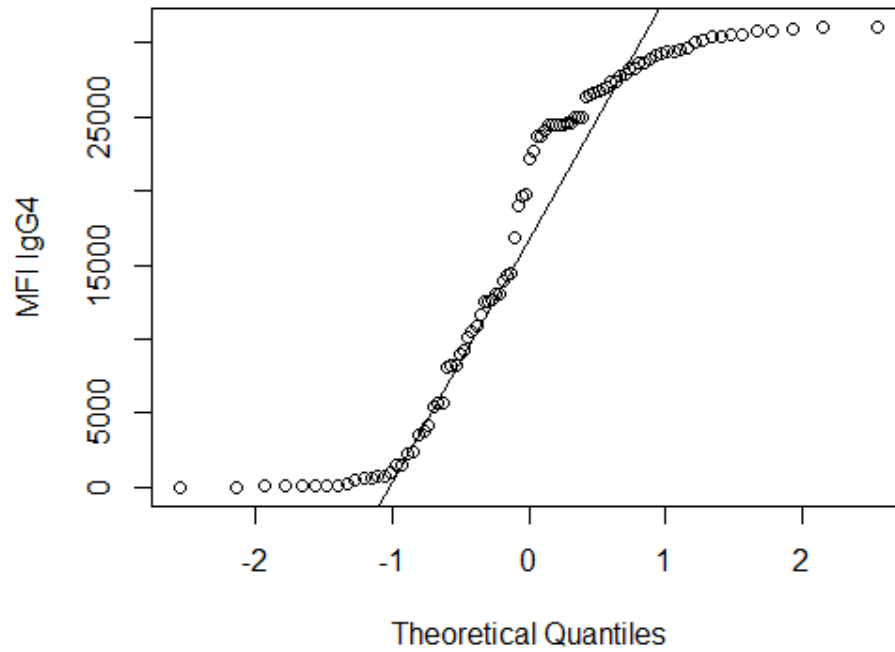
B.4 Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anticuerpos IgG con microesferas acopladas con OV33



B.5 Curva ROC del poder diagnóstico del ensayo múltiplex para determinación de anticuerpos IgG4 con microesferas acopladas con OV33



B.6 Gráfico Q-Q de las mediciones de OV17 IgG4



B.7 Gráfico Q-Q de las mediciones de OV33 IgG4

