



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio del microbioma: cuantificación de la translocación bacteriana en muestras de pacientes infectados por el VIH.

Autor/es

RAQUEL GARCÍA ROYO

Director/es

JOSE ANTONIO OTEO REVUELTA y C. PATRICIA PEREZ MATUTE ,

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2016-17



Estudio del microbioma: cuantificación de la translocación bacteriana en muestras de pacientes infectados por el VIH., de RAQUEL GARCÍA ROYO (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

Trabajo de Fin de Máster

**Estudio del microbioma:
cuantificación de la translocación
bacteriana en muestras humanas**

Autor:

Raquel García Royo

Tutor/es: José Antonio Oteo, Patricia Pérez Matute
CIBIR-Hospital San Pedro

MÁSTER:

Máster en Química y Biotecnología (760M)

Escuela de Máster y Doctorado



AÑO ACADÉMICO: 2016/2017

Índice

1. Resumen/Abstract	4
2. Introducción	6
2.1. La translocación bacteriana.....	6
2.2. Translocación bacteriana e infección por VIH.	8
2.3. La importancia clínica de la translocación bacteriana	10
3. Objetivos/Plan de trabajo	12
4. Desarrollo.....	13
4.1. Puesta a punto del Kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 (CAMBREX).....	13
4.1.1. Fundamento del kit	13
4.1.2. Reactivos, equipamiento y condiciones de almacenaje	15
4.1.3. Preparación de los reactivos.....	19
4.1.4. Preparación de las muestras	20
4.1.5. Detalles de la realización del Procedimiento	21
4.1.6. Pruebas realizadas y conclusiones obtenidas	22
4.2. Puesta a punto del kit Cloud-Clone Corp CEB526Ge ELISA para LPS	32
4.2.1. Fundamento del kit	32
4.2.2. Reactivos, equipamiento y condiciones de almacenaje	33
4.2.3. Preparación de los reactivos.....	35
4.2.4. Preparación de las muestras	36
4.2.5. Detalles del procedimiento.....	36
4.2.6. Pruebas realizadas y conclusiones obtenidas	39
4.3. Comparación de resultados entre ambos kits.	45
4.4. Estudio de concentración de LPS en muestras de pacientes VIH....	46
4.4.1. Experimento 1: estudio en muestras de plasma EDTA.....	46
4.4.2. Experimento 2: Estudio de muestras de suero humanas.....	49
4.4.3. Comparación de resultados entre muestras de suero y plasma con el kit Cloud-Clone.	52
5. Estudio comparativo con otros marcadores de translocación bacteriana	53
6. Conclusiones	57
7. Bibliografía	59

1. Resumen/Abstract

La infección por VIH está directamente relacionada con una alteración de la integridad de la barrera intestinal, lo que produce una disminución de la permeabilidad y, como consecuencia, favorece el paso de bacterias y productos/fragmentos bacterianos a la circulación sistémica. Este fenómeno se denomina translocación bacteriana (TB). Modular la TB surge como una herramienta terapéutica prometedora para mejorar la inmunoactivación crónica y sus consecuencias a largo plazo no sólo en la infección por el VIH sino también de en otras patologías con gran impacto en nuestra población. Sin embargo, como paso previo a poder modular esta TB es necesario cuantificarla de forma correcta. Según nuestro conocimiento, no existe a día de hoy un acuerdo sobre cuál es el biomarcador más fiable (“*gold-standard*”) de TB. El LPS (fragmento de la membrana de las bacterias gram-negativas) se viene utilizando como marcador de TB en la mayoría de los estudios. Sin embargo, este ensayo presenta muchas dificultades técnicas y estudios previos han puesto en tela de juicio su validez, proponiendo otros marcadores alternativos. Los objetivos del presente trabajo fueron 1) Conocer las condiciones óptimas necesarias para determinar los niveles de LPS mediante dos kits comerciales en muestras humanas y 2) Comparar los valores obtenidos para el LPS con otros parámetros empleados para la cuantificación de translocación bacteriana como son el sCD14, el LBP e iFABP. Nuestros resultados demostraron diferencias en los resultados obtenidos entre un kit de determinación de LPS y otro y también se observaron discrepancias en los resultados obtenidos dentro del mismo kit al emplear diferentes muestras, lo cual pone de relieve que LPS no es un marcador fiable para cuantificar la TB ya que es difícil su estandarización y comparación con otros estudios. Sin embargo, otros marcadores parecen ser más consistentes.

HIV infection is directly related to an alteration in the integrity of the intestinal barrier, which causes a decrease in permeability and, as a consequence, favors the passage of bacteria and bacterial products / fragments into the systemic

circulation. This phenomenon is called bacterial translocation (TB). Modulating TB emerges as a promising therapeutic tool to improve chronic immunoactivation and its long-term consequences not only in HIV infection but also in other pathologies with great impact on our population. However, as a previous step to be able to modulate this TB it is necessary to quantify it correctly. To our knowledge, there is no agreement today on which is the gold standard of TB. LPS (membrane fragment of gram-negative bacteria) has been used as a marker of TB in most studies. However, this trial presents many technical difficulties and previous studies have questioned its validity, proposing other alternative markers. The objectives of the present work were: 1) To know the optimal conditions necessary to determine the levels of LPS by two commercial kits in human samples and 2) To compare the values obtained for the LPS with other parameters used for the quantification of bacterial translocation such as sCD14, The LBP and iFABP. Our results showed differences in the results obtained between one kit of determination of LPS and another, and also discrepancies were observed in the results obtained within the same kit when using different samples, which highlights that LPS is not a reliable marker to quantify the TB since its standardization and comparison with other studies is difficult. However, other markers seem to be more consistent.

2. Introducción

2.1. La translocación bacteriana

En condiciones normales, la mucosa intestinal presenta una estructura compuesta por un epitelio monoestratificado, fuertemente unido por uniones celulares y recubiertas de moco rico en IgA. Además, existen péptidos intestinales, anticuerpos, macrófagos y otros componentes inmunitarios que dificultan el contacto y paso de bacterias patógenas o componentes bacterianos a estructuras más profundas del intestino (Ilustración 1A). Además los enterocitos que forman una capa unicelular junto al epitelio, se encargan de absorber el agua y los nutrientes durante la digestión; lo cual es esencial para la supervivencia del individuo. (1)

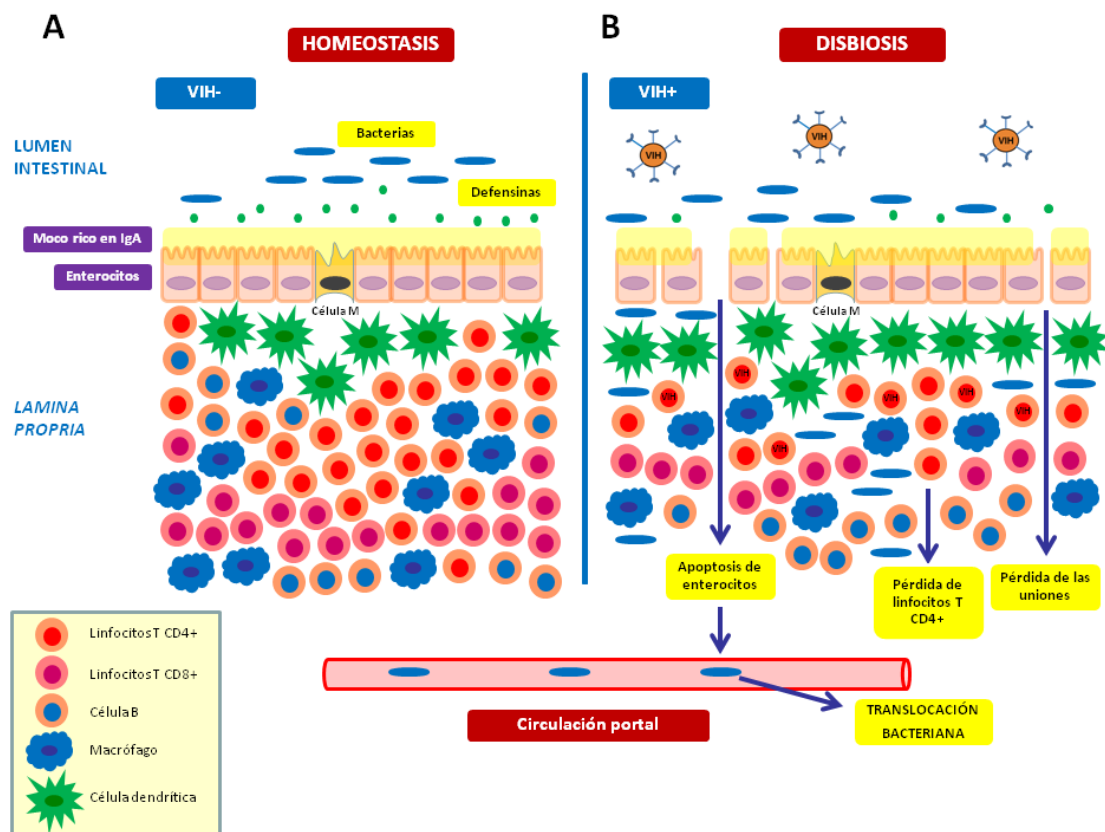


Ilustración 1: "Cambios en el Microbioma en VIH/SIDA" (2)

En algunas ocasiones, como ocurre tras la infección crónica por el virus VIH o por el virus de la Hepatitis, o tras la ingesta excesiva de alcohol, de quimioterápicos o en otras patologías (obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal etc.), la integridad de la superficie del intestino se pierde, entre otros mecanismos por una expresión reducida de genes que codifican para proteínas de unión entre enterocitos (ZO-1 y occludina) (3) (4)

Como consecuencia algunos microorganismos o componentes de los mismos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) procedente de las bacterias Gram negativas pasan a la *lamina propria* y, eventualmente, a la circulación sistémica sin que se aprecien datos clínicos de bacteriemia. Es lo que se conoce comúnmente como “*Translocación Bacteriana*”. Esta translocación bacteriana provoca una inmunoactivación que lleva al desarrollo de un estado inflamatorio crónico con efectos deletéreos sobre la salud. (5) (6)

El proceso inflamatorio se inicia cuando el LPS circulante se une a la LBP (*lipopolysaccharide binding protein*), que es una proteína producida por el hígado, y este complejo va a unirse a los receptores de la pared celular del receptor CD14, que se expresa fundamentalmente en monocitos, macrófagos, granulocitos, y en menor intensidad en los linfocitos B. El CD14, que puede encontrarse también en forma soluble (sCD14) actúa, a su vez, como co-receptor del tándem TLR4-MD-2 y activan patrones complejos moleculares y vías de señalización intracelulares que inducen la síntesis y liberación de factores relacionados con la inflamación, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), y/o las interleuquinas 1 y 6 (6). Más específicamente, el complejo LPS-LBP-CD14 se une al TLR4 y a la proteína MD-2 de las células. En aquellos tipos celulares que carecen de receptores CD14 (como en las células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos, células del músculo liso), esta cascada se inicia uniéndose el complejo LPS-LBP al CD14 soluble circulante en el plasma (7). A pesar de que el anteriormente citado complejo LPS/LBP se une sobre todo a los receptores TLR4 y MD-2, existen otros receptores de la pared celular que también reconocen al LPS e inducen una respuesta inflamatoria como son el MSR (*macrophage scavenger receptor*), canales de K $^{+}$, y los receptores CD11/CD18. En todos los casos, esta unión causa la activación de quinasas y promueve la movilización del factor NF-K β ,

quien, a su vez, activa a los genes responsables de la respuesta inflamatoria o a aquellos productores de citoquinas inflamatorias como los anteriormente citados TNF α , IL-1 o IL-6 (Ilustración 2).

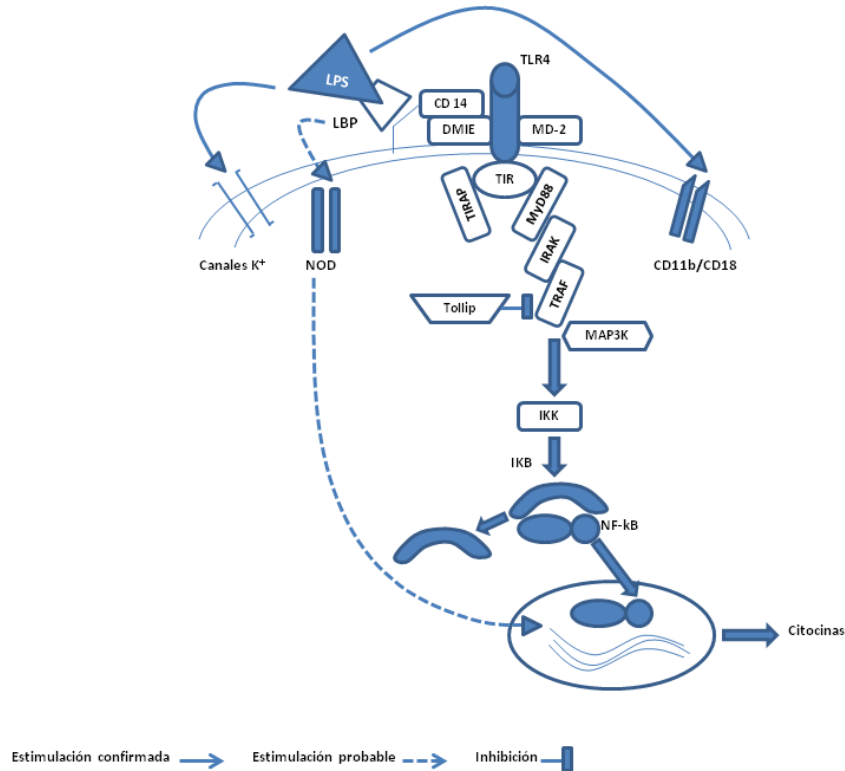


Ilustración 2: Cascada de señalización del LPS (Translocación bacteriana). (Modificada de Ortiz et al., 2005; Pérez-Matute et al., 2016). (7) (2)

2.2. Translocación bacteriana e infección por VIH.

El tracto gastrointestinal es el principal sitio de replicación del VIH, independientemente de la vía de adquisición del virus (8). El tejido linfoide asociado al intestino (GALT) es donde la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ están alojados (9) (10). Estos linfocitos, a diferencia de lo que sucede en las células mononucleares de la sangre periférica, son linfocitos T de memoria en un estado continuo de activación, lo que hace que sean muy susceptibles a la infección por el VIH (11). La primera etapa en la infección por el VIH es, precisamente, el agotamiento preferencial de las células CD4⁺ que expresan el co-receptor CCR5 y CXR4 y que residen en el intestino, aunque posteriormente afecta a todas las células T CD4⁺ del organismo. Tras el tratamiento antirretroviral, se observa una restauración significativa de células CD4⁺ en la

sangre periférica lo cual contrasta con la restauración parcial y lenta observada en las células del tracto gastrointestinal (12) (13). Actualmente, se desconoce el motivo de esta restauración tan pobre a nivel intestinal. También la infección de los macrófagos presentes en la mucosa intestinal favorece la pérdida de las células CD4+, por la transmisión del virus “*célula a célula*” y también por secretar citoquinas que atraen y reclutan linfocitos T activados, los cuales, posteriormente, son infectados, potenciando la infección a nivel intestinal. Esta pérdida de células CD4+ (y especialmente de los linfocitos Th17) es seguida de alteraciones en la arquitectura del tejido linfoide, así como de alteraciones en la integridad y en la pérdida de la función de la barrera mucosa. En consecuencia, la pérdida de la protección inmune de la mucosa intestinal permite la translocación bacteriana (Ilustración 1B). Este proceso fue descrito por primera vez en pacientes infectados por el VIH en 2006 (14) y se ha demostrado que persiste a lo largo del todo el curso de la infección por el virus y que contribuye a la activación inmune que se observa en las fases crónicas de la infección. Además, el grado de translocación bacteriana está vinculada a la gravedad de la progresión del VIH independientemente de la viremia (15) (16) (17) (18) (19). Varios estudios han demostrado que la producción de sCD14 (empleado como marcador de translocación bacteriana) y de citoquinas pro-inflamatorias son parcialmente responsables de la reducción de células T CD4+ y de las comorbilidades relacionadas con el VIH, las cuales suponen un importante incremento de la morbi-mortalidad. Tras el tratamiento antirretroviral (TAR), el daño a nivel intestinal así como la translocación bacteriana se mejoran parcialmente, pero no del todo (20) (21). De hecho, se ha observado que tanto los denominados “respondedores parciales” (los que alcanzan tras el TAR un recuento de CD4+ mayor o igual a 250) como los designados como “no respondedores” (no llegan a alcanzar 250 CD4+) presentan niveles plasmáticos de LPS y de sCD14 similares tanto sin el TAR como tras 12 meses bajo TAR (22). Es, por tanto, lógico suponer que la translocación bacteriana (que apenas se ve disminuida por el TAR), pueda ser la causante de la restauración no completa del sistema inmune tras dicho tratamiento. De hecho, el mantenimiento de esa translocación bacteriana elevada a pesar de la supresión virológica inducida por el TAR parece estar asociada con un incremento en el

riesgo de que progrese la enfermedad y de la presencia de otras comorbilidades.

2.3. La importancia clínica de la translocación bacteriana

La translocación bacteriana crónica es una característica de la infección por VIH; así como de otras patologías con una elevada comorbilidad como son: enfermedades hepáticas, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y neurocognitivas. Ya se encuentra ampliamente aceptado que esta translocación es consecuencia de una alteración a nivel de la mucosa intestinal que comienza en la infección aguda y continúa a lo largo de la enfermedad crónica. Esta alteración a nivel de mucosa incluye la depleción de células T CD4, particularmente las células Th17, la hiperactivación e inflamación de la mucosa, el agotamiento de la función fagocítica de los macrófagos y un daño estructural del epitelio con la apoptosis de los enterocitos. (23)

Por todo lo hasta aquí indicado, modular la translocación bacteriana puede ser considerada una herramienta terapéutica prometedora para mejorar la inmunosupresión crónica y sus consecuencias a largo plazo no sólo observadas en la infección por el VIH sino también en otras patologías de gran impacto en la salud pública. Además, la evaluación de la translocación bacteriana también abre oportunidades únicas para la identificación de un nuevo marcador del estado fisiopatológico de cada individuo. Sin embargo, como paso previo a poder modular esta translocación bacteriana, se tiene que cuantificar de forma correcta. Según nuestro conocimiento, no existe acuerdo sobre cuál es el biomarcador más fiable (“gold-standard”) de translocación bacteriana. En este sentido, el LPS (fragmento de la membrana de las bacterias gram-negativas) se viene utilizando como marcador de la translocación bacteriana en la mayoría de los estudios en este campo (24)

Una manera de cuantificar la translocación bacteriana es la determinación de diversos productos bacterianos presentes en plasma, como pueden ser el LPS, o fragmentos de ADN y ARN bacterianos o moléculas como CD14s, LBP, etc. (24) (25) (2)

La determinación del LPS es una medida directa de la endotoxemia y puede realizarse mediante el kit comercial LAL (Pharma & Biotech). Sin embargo, este ensayo presenta muchas dificultades técnicas debidas a la posible

contaminación y a la inhibición por parte de los componentes del plasma sanguíneo, lo que dificulta su puesta a punto. Además, el LPS es un producto específico de la pared celular de las bacterias gram-negativas, por lo que no va a detectar la translocación de las bacterias gram-positivas. (23)

En este sentido, existen otros trabajos en los que lo ponen en tela de juicio su validez (26) y se proponen otros marcadores alternativos para cuantificar la translocación bacteriana como son la evaluación de los niveles plasmáticos de sCD14, LBP o incluso el iFABP, una proteína intestinal unidora de ácidos grasos empleada como marcador de la integridad de la mucosa intestinal y del daño de los enterocitos (27).

3. Objetivos/Plan de trabajo

- Conocer las condiciones óptimas necesarias para determinar los niveles de LPS mediante dos kits comerciales en muestras humanas. Comparar los resultados.
- Comparar los valores obtenidos para los niveles plasmáticos de LPS con otros parámetros empleados para la cuantificación de translocación bacteriana (sCD14, LBP e iFABP).

4. Desarrollo

4.1. Puesta a punto del Kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 (CAMBREX)

4.1.1. Fundamento del kit

Este kit es un test que mide endotoxina en medicamentos parenterales humanos y animales, muestras biológicas y utensilios médicos (FDA, 1987). El test utiliza un lisado modificado de amebocitos del *Limulus* y un sustrato sintético que produce color para detectar endotoxina cromogénicamente.

El fundamento de este kit se basa en las observaciones de Bang de la coagulación intravascular fatal que tenía lugar como consecuencia de la infección por una bacteria gram-negativa del cangrejo *Limulus polyphemus*. A partir de aquello, Levin y Bang (28), demostraron que esta coagulación se producía al reaccionar la endotoxina presente en las bacteria gram-negativas, con una proteína que contienen los amebocitos que se encuentran en la circulación del cangrejo. Con el fin de reproducir la reacción, prepararon un lisado de amebocitos purificados que sirviera como indicador de la presencia de endotoxina. Seguidamente, Solum y Yount, Levin y Prendergast, consiguieron purificar y caracterizar la proteína presente en los amebocitos, responsable de la reacción, y pudieron demostrar que ésta actúa como enzima de la reacción de coagulación.

En este kit, la endotoxina presente en las bacterias gram-negativas cataliza la activación de la proteína (proenzima) que contiene el lisado de amebocitos del cangrejo (LAL). El grado de activación de esta proenzima dependerá de la concentración de endotoxina presente. Una vez activada, la enzima cataliza la transformación del sustrato sin color *Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA* al producto con color amarillo *pNA*. La reacción se detiene con un reactivo stop y a continuación se mide la *pNA* fotométricamente a 405-410 nm. La absorbancia medida se correlaciona con la concentración presente de endotoxina de forma lineal dentro del rango de 0.1-1.0 EU/ml. Para calcular la concentración de endotoxina de la muestra se emplea la curva obtenida a partir de la medida de los estándares, que son soluciones que contienen una concentración de endotoxina conocida. (29)

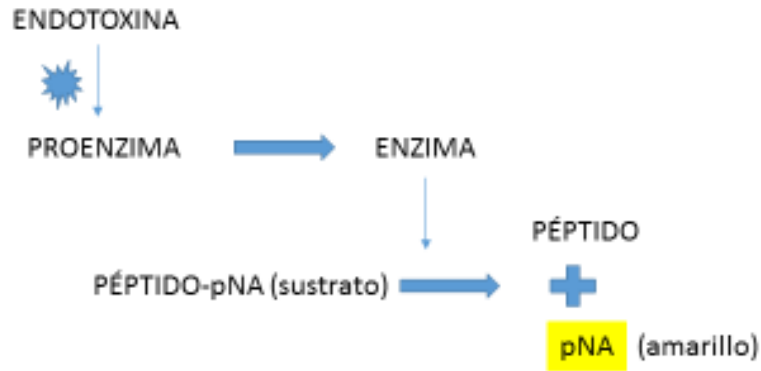


Ilustración 3. Esquema de la reacción.

Brevemente, la metodología a seguir en este kit es la siguiente:

En el kit QCL-1000™, se mezclan 50 µl de muestra con el reactivo LAL (lisado de amebocitos de Limulus) y se incuban a 37°C +/-1°C durante 10 minutos. A continuación, se añade el sustrato (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg- pNA) y se incuban a la misma temperatura durante 6 minutos. La reacción se detiene con el reactivo stop. Si la endotoxina (LPS) está presente en la muestra, cataliza la liberación de la pNA del resto del sustrato, apareciendo color amarillo. Inmediatamente, se mide la absorbancia de la muestra espectrofotométricamente a 405-410 nm. La absorbancia obtenida es directamente proporcional a la cantidad de endotoxina presente en la muestra. A continuación, la concentración de LPS puede calcularse a partir de la curva estándar. El kit QCL-1000™ tiene un rango de sensibilidad 0.1 EU/ml - 1.0 EU/ml.

El paso más interesante y limitado de este experimento es que la muestra tiene que ser recogida de forma aséptica en tubos especiales que no contengan endotoxina detectable. De este modo y con el objetivo de minimizar la adsorción de endotoxina, se necesitan los siguientes materiales:

- tubos y contenedores de vidrio despirogenados reutilizables
- tubos y contenedores de poliestireno

Además, hay que tener en cuenta que sustancias que desnaturalizan proteínas, quelan iones, unen endotoxina o alteran el estado hidrofóbico de la endotoxina podrían interferir también en la prueba. Por todo ello, en principio

se prefieren las muestras de suero frente a las de plasma EDTA, aunque es interesante estudiar ambos tipos de muestra.

4.1.2. Reactivos, equipamiento y condiciones de almacenaje

Los reactivos incluidos en el kit comercial son: Agua LAL, que es un agua especial para poder realizar medidas de endotoxina, necesaria para reconstituir los reactivos y para el blanco; LAL, endotoxina y sustrato. En la tabla siguiente se resumen las condiciones de almacenaje:

Reactivo	Condiciones
Agua de reactivo LAL	Conservar a 2-8°C
LAL	Conservar a 2-8°C Evitar exposición a la luz. Una vez reconstituido, conservar a -10°C no más de una semana.
Endotoxina	Conservar a 2-8°C Una vez reconstituida, conservar a 2-8°C no más de cuatro semanas.
Sustrato	Conservar a 2-8°C Una vez reconstituido, conservar a 2-8°C no más de cuatro semanas. Evitar exposición a la luz.

Además de lo incluido en el kit, se necesitan los siguientes materiales y reactivos:

-Mascarilla, manguitos y guantes, para evitar la contaminación por endotoxina de la muestra y los reactivos.

-Etanol, para limpiar la zona de trabajo, antes de realizar el experimento para conseguir una superficie lo más aséptica posible.

-Reactivo stop: En el manual recomiendan que el reactivo para parar la reacción sea ácido acético al 25% v/v o bien, dodecilsulfato sódico (SDS) 10g/100ml en agua. Se decide utilizar el SDS, ya que en anteriores experimentos con este kit, ha dado buenos resultados.

-Hidróxido de sodio 0,1 N, disuelto en el agua de reactivo LAL para ajustar el pH de la muestra entre 6,0 -8,0 para evitar la inhibición.

-HCL 0,1 N diluido en agua de reactivo LAL para ajustar el pH

-Tubos endotoxin-free 13x100 mm para preparar las diluciones de la muestras.

-Pipetas de 50ul, 100 ul, 1000 ul.

-Puntas endotoxin-free.

-Placa estéril de 96 pocillos para realizar el experimento en ella y posteriormente, llevar a cabo la lectura directamente en el espectrofotómetro.

-Pipeta multicanal para añadir los reactivos en los diferentes pocillos de una forma más homogénea en el tiempo.

-Termobloque o incubador a 37 °C +/-1, para mantener la temperatura adecuada a las condiciones indicadas en el kit.

-Cronómetro, para controlar los tiempos de reacción del experimento.

-Vórtex para mezclar bien las diluciones de las muestras y para reconstituir correctamente la endotoxina.

-Espectrofotómetro capaz de leer a longitudes de onda de 405-410 nm.

El lugar del experimento tiene que ser lo más aséptico posible para evitar contaminaciones. Se decide que de todas las opciones, que existen en el CIBIR, la más apropiada es el empleo de la cabina de flujo laminar Telstar modelo BV-100 en la sala de cultivos celulares, situada en la 2ª planta del CIBIR. Dicha campana será desinfectada con etanol antes de llevar a cabo el ensayo.

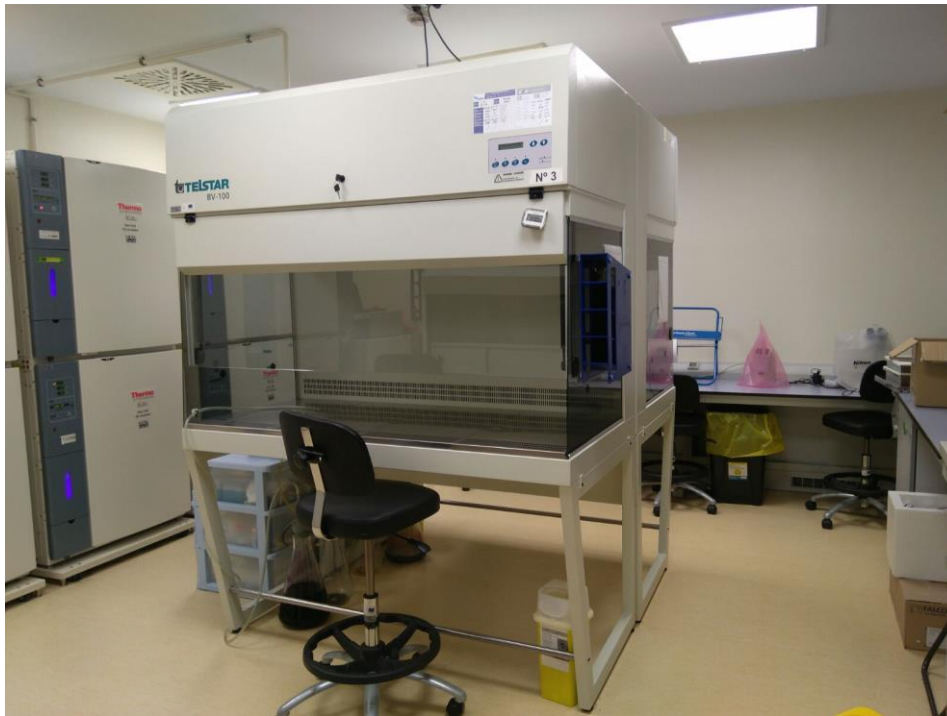


Ilustración 4. Cabina de flujo laminar Telstar modelo BV-100.

El primer punto crítico del experimento es el adecuado mantenimiento de la temperatura. Según el protocolo, una de las condiciones para el buen funcionamiento del kit es el mantenimiento a lo largo de los 16 minutos que dura el experimento de una temperatura de 37°C, que debe ser homogénea en toda la placa, donde se desarrolla el análisis. Para ello, se empleará un termobloque con dos bloques macizos conductores de calor y sobre ellos, se coloca la placa, en cuyos pocillos se ha añadido agua destilada.

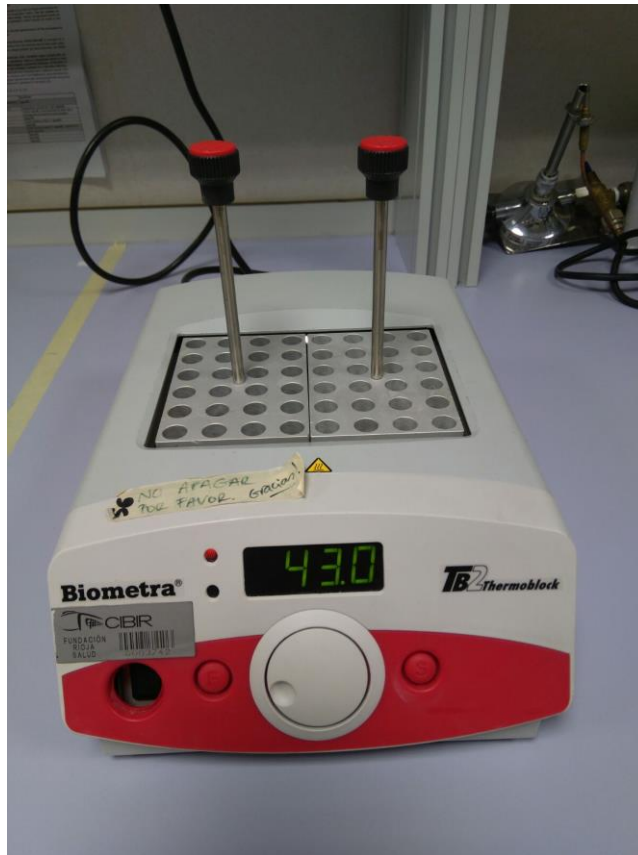


Ilustración 5. Termobloque Biometra.

Se programa la temperatura a 37°C, no obstante, la primera dificultad con la que nos encontramos es que al medir la temperatura del agua con una sonda cada 5 minutos, el líquido no alcanza la temperatura deseada. Sin embargo, si se programa el termobloque a 50°C, la temperatura que se alcanza en el interior de los pocillos es de 34°C. Pero cabe destacar que no en todos se alcanza la misma, siendo mayor en los pocillos centrales. Por todo ello, el termobloque anterior no parece ser apropiado para llevar a cabo el experimento, así que se decide probar con un Termomixer, que tiene unas dimensiones apropiadas para acoger dentro la placa del ensayo. Además, se puede agitar, sin necesidad de retirar la placa del soporte que aporta la temperatura.



Ilustración 6. Termomixer.

Se prueba a 37 °C y con agua destilada, de igual forma que en el caso anterior. La temperatura alcanzada en los pocillos tampoco es suficiente, no alcanza los 37°C, pero si se observa una mayor homogeneidad en toda la placa, lo cual es positivo. Finalmente, se determina que para alcanzar 37°C en los pocillos, el Termomixer debe ser programado a 44°C.

4.1.3. Preparación de los reactivos

En cada serie de determinaciones, se usan cuatro soluciones estándar de endotoxina para poder construir la recta patrón. Estas soluciones estándar van a contener una concentración de endotoxina de 1.0 EU/ml, 0.5 EU/ ml, 0.25 EU/ml y 0.1 EU/ml. Para prepararlas, se realizan diluciones seriadas partiendo de la primera solución de 1.0 EU/ml. Esta solución se obtiene a partir de la solución stock de endotoxina incluida en el kit. Dicha solución es reconstituida con 1 ml de agua LAL. Es importante agitarla bien, en un vórtex, durante al menos 15 minutos, para evitar la adsorción de endotoxina por parte de las paredes del vial. Esta solución stock del kit contiene una concentración de endotoxina diferente, dependiendo del lote. Es por eso, que es necesario consultar en la página web (<http://www.lonza.com/products-services/pharma-biotech/endotoxin-detection.aspx>) la concentración de endotoxina del kit que

disponemos. Por ejemplo, si la concentración es de 23 EU/ml, la dilución inicial de 1.0 EU/ml, se preparará diluyendo 0.1 ml de la solución stock en 2.2 ml de agua.

El resto de reactivos se preparan como se indica a continuación:

-LAL: Es el lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*. Debe ser reconstituido justo antes de su utilización, usando 1,4 ml de agua LAL. Se mezcla sin formar espuma y se protege de la luz cubriendo con papel de aluminio el envase.

-Sustrato cromogénico: Se reconstituye con 6,5 ml de agua LAL y se protege de la luz, tal y como se indica en el manual del kit, cubriendo con papel de aluminio el envase.

4.1.4. Preparación de las muestras

Las muestras deben almacenarse de tal manera que no haya actividad bacteriana y que los niveles de endotoxinas no vayan a aumentar en el tiempo. Por ejemplo, si se conservan durante menos de 24 horas, se mantendrán 2-8°C, y si es más tiempo, deberán ser congeladas, según se indica en el manual del kit. Las muestras utilizadas en este caso, han sido conservadas a -80°C.

Las muestras que se van a estudiar en este trabajo son muestras de suero y de plasma EDTA de pacientes infectados por VIH y recogidas por el personal del Departamento de Enfermedades Infecciosas del CIBIR.

Es necesario ajustar el pH de la muestra para conseguir un rango entre 6.0-8.0, usando NaOH y HCL y empleando siempre material libre de endotoxinas (*endotoxin-free*) para evitar contaminaciones en este paso.

Tras el ajuste de pH, ha de valorarse a qué concentración han de añadirse dichas muestras para que no se produzca el fenómeno de inhibición.

La inhibición ocurre cuando las sustancias de la muestra interfieren con la reacción de LAL. En el ensayo, esta inhibición se traduce en una menor absorbancia final, lo cual se interpreta como menos concentración de endotoxina de la realmente existente.

Para verificar la ausencia de inhibición, se le añade a una alícuota de la muestra y de sus diluciones una cantidad conocida de endotoxina de 0,4 EU/ml. (solución *spiked*). Tanto la solución *spiked* como la misma solución sin

la concentración conocida de *spiked* son cuantificadas espectrofotométricamente. La diferencia entre ambas concentraciones indica si hay inhibición o no. Si no hay inhibición, la diferencia debería ser la cantidad de endotoxina conocida, es decir 0,4 EU /ml.

Para evitar el fenómeno de la inhibición, es necesario averiguar la concentración a la que debemos diluir las muestras y así, impedir que ocurra.

En nuestro proyecto, se realizaron varias pruebas tal y como se exponen en el apartado 4.1.6.

4.1.5. Detalles de la realización del Procedimiento

Con este kit se puede realizar el experimento por dos métodos diferentes: el método de tubos y el método de placa. No obstante, por el equipamiento disponible en el CIBIR, se optó por el método de placa como el más apropiado.

Método de placa

1. Pre-equilibrar la placa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ en el *Termomixer*. Cada serie de determinaciones debe incluir un blanco más cuatro estándar de endotoxinas por duplicado. El blanco contiene 50 ul de agua de reactivo LAL.

2. Añadir 50 ul de la cada muestra a cada uno de los dos pocillos, usando una pipeta multicanal si fuera necesario. Seguir siempre el mismo orden.

3. A $t=0$, añadir 50 ul de LAL a cada pocillo. Mezclar bien.

4. A $t=10$, añadir 10 ul de sustrato, pretemperado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$. Mezclar bien.

5. A $t= 16$, añadir 50 ul de reactivo stop. Mezclar bien. Mantener el mismo orden.

Finalmente, se lee la absorbancia de la placa a 405-410 nm. Si con 300 ul de producto no se consigue una lectura adecuada, la última reacción puede hacerse añadiendo solo 50 ul del reactivo stop, sin verse afectados los resultados.

La concentración de endotoxina presente en las muestras se calcula extrapolando de la recta patrón calculada a partir de los estándares. Para ello, se colocan las absorbancias de los estándares en el eje Y frente a su concentración correspondiente (concentración conocida) en el eje X, como se observa en la siguiente gráfica, que corresponde con la primera prueba

realizada. Así, con la ecuación que se obtiene de la recta, se calculan las concentraciones de endotoxina.

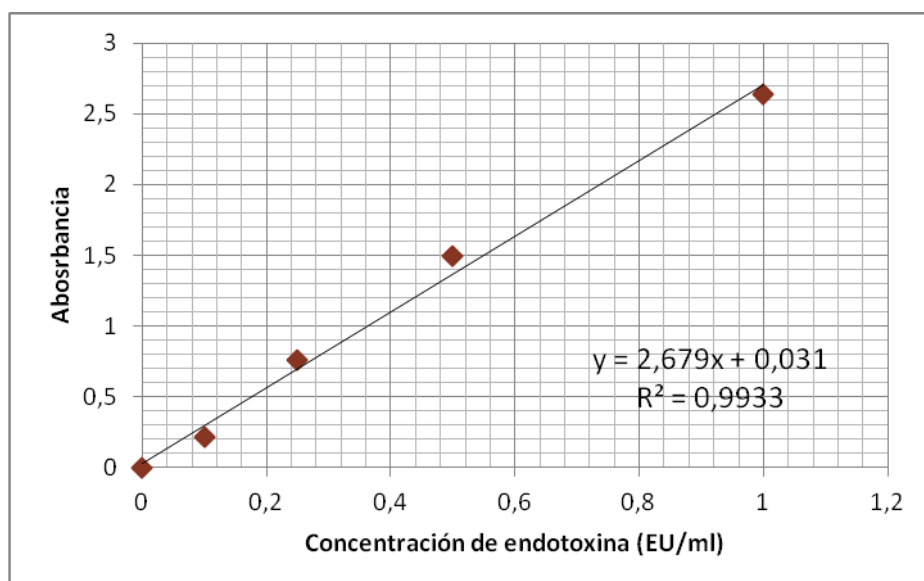
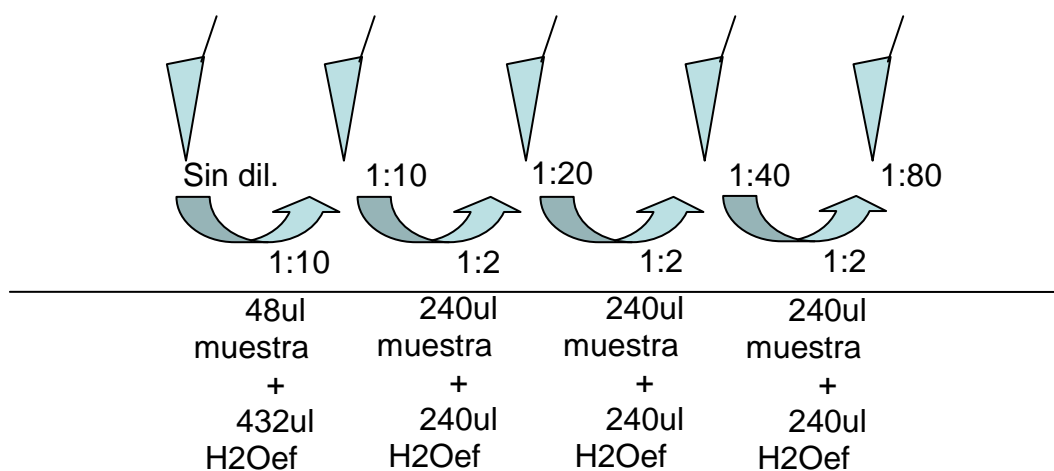


Ilustración 7. Recta patrón Absorbancia vs concentración de endotoxina.

4.1.6. Pruebas realizadas y conclusiones obtenidas

Prueba 1

Las muestras que se utilizaron fueron de plasma EDTA humano (A, B y C). Cada una de ellas se llevó a las diluciones de 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 con agua libre de endotoxinas (endotoxin-free). Para ello, se realizaron las siguientes diluciones seriadas indicadas a continuación, calculadas para gastar la menor cantidad de muestra posible:



Para preparar las soluciones *spiked* (+0.4) se mezclaron 72ul de cada muestra a diferente dilución con 48ul de solución de endotoxina 1.0 EU/ml, según las proporciones sugeridas por el manual del kit.

Una vez preparadas todas las soluciones, se procedió a realizar la prueba, añadiendo las diferentes diluciones de las muestras y sus correspondientes soluciones *spiked*, a la placa, siguiendo el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0.25	A 1:10	A 1:10 +0.4	B 1:10	B 1:10 +0.4	C 1:10	C 1:10 +0.4				
B	0	0.5	A 1:10	A 1:10 +0.4	B 1:10	B 1:10 +0.4	C 1:10	C 1:10 +0.4				
C	0	0.5	A 1:20	A 1:20 +0.4	B 1:20	B 1:20 +0.4	C 1:20	C 1:20 +0.4				
D	0.1	0.5	A 1:20	A 1:20 +0.4	B 1:20	B 1:20 +0.4	C 1:20	C 1:20 +0.4				
E	0.1	1	A 1:40	A 1:40 +0.4	B 1:40	B 1:40 +0.4	C 1:40	C 1:40 +0.4				
F	0.1	1	A 1:40	A 1:40 +0.4	B 1:40	B 1:40 +0.4	C 1:40	C 1:40 +0.4				
G	0.25	1	A 1:80	A 1:80 +0.4	B 1:80	B 1:80 +0.4	C 1:80	C 1:80 +0.4				
H	0.25		A 1:80	A 1:80 +0.4	B 1:80	B 1:80 +0.4	C 1:80	C 1:80 +0.4				

Los resultados de la prueba se resumen en la siguiente tabla. En ella, se expone la concentración de endotoxina (C) obtenida en las cuatro diluciones de cada muestra y en las cuatro diluciones *spiked*. La última columna es la diferencia de concentración de endotoxina entre la dilución *spiked* y la dilución.

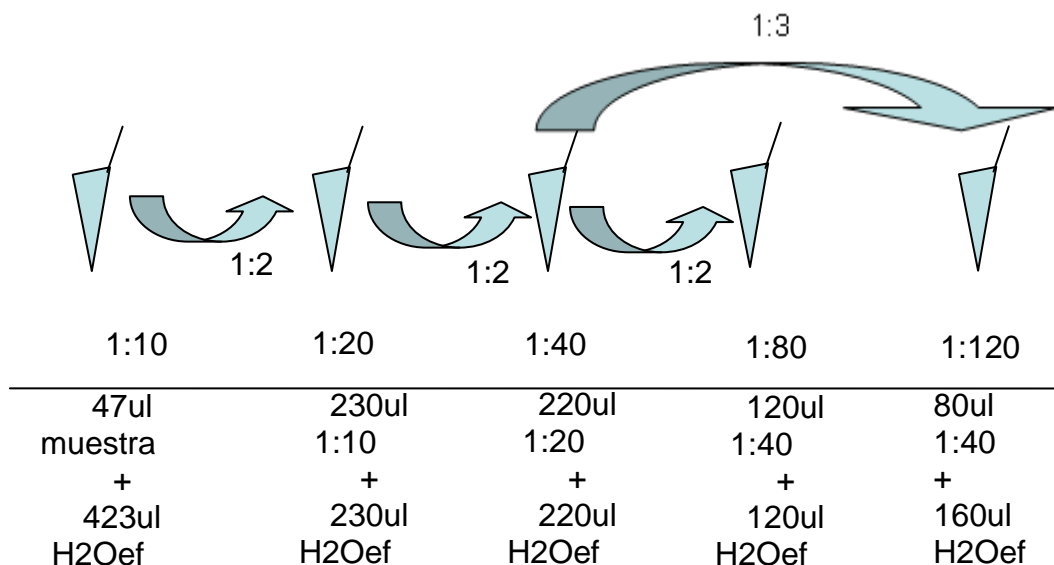
Muestra	Dilución	C (EU/ml)	Dilución <i>spiked</i>	C (EU/ml)	<i>Spiked</i> (EU/ml)
A	1:10	0.0138	1:10 +0.4	0.0029	-0.0108
	1:20	0.0004	1:20 +0.4	0.0125	0.0122
	1:40	-0.0025	1:40 +0.4	0.1560	0.1585
	1:80	-0.0093	1:80 +0.4	0.2269	0.2361

B	1:10	0,0248	1:10 +0.4	0,0136	-0,0112
	1:20	0,0060	1:20 +0.4	0,0174	0,0114
	1:40	-0,0015	1:40 +0.4	0,1220	0,1235
	1:80	-0,0077	1:80 +0.4	0,1949	0,2026
C	1:10	0,0179	1:10 +0.4	0,0962	0,0784
	1:20	0,0068	1:20 +0.4	0,0086	0,0018
	1:40	-0,0058	1:40 +0.4	0,1165	0,1223
	1:80	-0,0091	1:80 +0.4	0,2264	0,2355

Como muestran los resultados, en esta prueba no se consigue alcanzar la dilución que evite la inhibición, ya que en ninguna de las medidas se obtiene la concentración de endotoxina añadida (*spiked*) de 0.4 EU/ml. Por tanto, ninguna de las diluciones demuestra la ausencia de inhibición. Es por eso que se decidió llevar a cabo un nuevo ensayo ampliando el rango de diluciones y siguiendo los mismos pasos.

Prueba 2

En esta prueba se utilizaron tres muestras de plasma EDTA humano (A, B y C) diluidas a 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:120. Las soluciones se prepararon siguiendo el siguiente esquema de diluciones seriadas:



Las soluciones spiked se prepararon añadiendo 46 ul de solución de endotoxina 1.0 EU/ml a 69 ul de solución diluida de muestra.

Una vez preparadas todas las soluciones, se procedió a realizar la prueba, añadiendo las diferentes diluciones de las muestras y sus correspondientes soluciones *spiked*, a la placa, siguiendo el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0.25	A 1/10	A 1/120	A 1/80 +	B 1/10	B 1/120	B 1/80 +	C 1/10	C 1/120	C 1/80 +	
B	0	0.5										
C	0	0.5	A 1/20	A 1/10 +	A 1/120 +	B 1/20	B 1/10 +	B 1/120 +	C 1/20	C 1/10 +	C 1/120 +	
D	0.1	0.5										
E	0.1	1	A 1/40	A 1/20 +		B 1/40	B 1/20 +		C 1/40	C 1/20 +		
F	0.1	1										
G	0.25	1	A 1/80	A 1/40 +		B 1/80	B 1/40 +		C 1/80	C 1/40 +		
H	0.25											

Los resultados de la prueba se resumen en la siguiente tabla. En ella, se expone la concentración de endotoxina obtenida en las cuatro diluciones de cada muestra y en las cuatro diluciones *spiked*. La última columna es la diferencia de concentración de endotoxina entre la dilución *spiked* y la dilución.

Muestra	Dilución	C(EU/ml)	Dilución <i>spiked</i>	C(EU/ml)	<i>Spiked</i> (EU/ml)
A	1:10	0,0751	1:10 +0.4	0,0763	0,0012
	1:20	0,0459	1:20 +0.4	0,0493	0,0034
	1:40	0,0312	1:40 +0.4	0,0684	0,0372
	1:80	0,0255	1:80 +0.4	0,1957	0,1702
	1:120	0,0213	1:120 +0.4	0,3800	0,3587
B	1:10	0,0962	1:10 +0.4	0,1012	0,0050
	1:20	0,0668	1:20 +0.4	0,0660	-0,0007
	1:40	0,0386	1:40 +0.4	0,0684	0,0297
	1:80	0,0276	1:80 +0.4	0,1860	0,1584
	1:120	0,0226	1:120 +0.4	0,3808	0,3582
C	1:10	0,0664	1:10 +0.4	0,0708	0,0043
	1:20	0,0400	1:20 +0.4	0,0427	0,0027
	1:40	0,0290	1:40 +0.4	0,0622	0,0332
	1:80	0,0295	1:80 +0.4	0,2004	0,1709
	1:120	0,0185	1:120 +0.4	0,3210	0,3024

En esta prueba tampoco se consigue evitar la inhibición, ya que aunque en las muestras diluidas a 1:120 se alcanza un spiked cercano a 0.4 EU/ml, por tratarse de diluciones tan elevadas, no resultarían fiables a la hora de medir endotoxina en las muestras. La concentración de endotoxina medida en diluciones tan altas, sería próxima a cero, debido precisamente a la dilución realizada.

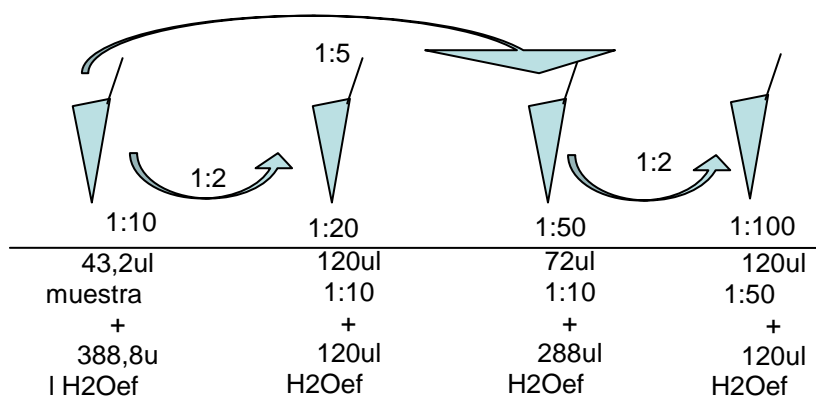
La principal hipótesis que se baraja ante la inhibición tan elevada observada, es que es el propio EDTA de las muestras el que proporciona componentes que interfieren en la reacción. Por ello, se plantea una tercera prueba, pero en este caso empleando muestras de suero.

Prueba 3

Para ver si el EDTA está produciendo inhibición, se probó a realizar el ensayo con muestras de suero.

Para esta prueba, se utilizaron muestras de suero (A y B). Estas muestras corresponden al mismo individuo que las muestras A y B de plasma EDTA. Al

igual que en el resto de pruebas, se prepararon las diluciones de las muestras, en este caso, a 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100. Además, se decidió incluir en el ensayo las muestras sin diluir. Las diluciones se prepararon siguiendo el siguiente esquema:



Las soluciones *spiked* se prepararon añadiendo 46 ul de solución de endotoxina 1.0 EU/ml a 69 ul de solución diluida de muestra.

Una vez preparadas todas las soluciones, se procedió a realizar la prueba, añadiendo las diferentes diluciones de las muestras y sus correspondientes soluciones *spiked*, a la placa, siguiendo la misma dinámica que en las dos pruebas anteriores.

Los resultados de la prueba se resumen en la siguiente tabla. En ella, se expone la concentración de endotoxina obtenida en las cuatro diluciones de cada muestra y en las cuatro diluciones *spiked*. La última columna es la diferencia de concentración de endotoxina entre la dilución *spiked* y la dilución.

Muestra	Dilución	C (EU/ml)	Dilución <i>spiked</i>	C (EU/ml)	<i>Spiked</i> (EU/ml)
A	Sin dil.	1,770	Sin dil. +0.4	1,688	-0,086
	1:10	0,267	1:10 +0.4	0,275	0,007
	1:20	0,156	1:20 +0.4	0,191	0,035
	1:50	0,153	1:50 +0.4	0,459	0,306
	1:100	0,135	1:100 +0.4	0,361	0,226
B	Sin dil.	0,697	Sin dil. +0.4	0,704	0,008
	1:10	0,190	1:10 +0.4	0,190	0,000
	1:20	0,188	1:20 +0.4	0,221	0,033

	1:50	0,137	1:50 +0.4	0,248	0,112
	1:100	0,128	1:100 +0.4	0,305	0,176

Al igual que en el resto de pruebas realizadas, no se alcanza la dilución adecuada para evitar la inhibición. Al menos bajo nuestras condiciones, nuestros resultados sugieren que este kit no es apropiado para medir endotoxina (LPS) en muestras sanguíneas de pacientes con VIH.

En la tabla siguiente se muestran agrupadas las pruebas realizadas con el kit de LONZA.

Kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 (CAMBREX)			
Prueba 1	Muestras	Diluciones	Conclusiones
	Plasma EDTA	1:10, 1:10+ SPK 1:20, 1:20 +SPK 1:40, 1:40 +SPK 1:80, 1:80 +SPK	Ninguna de las diluciones demuestra la ausencia de inhibición. La dilución de 1/80 es la que más se aproxima
Prueba 2	Muestras	Diluciones	Conclusiones
	Plasma EDTA	1:10, 1:10+ SPK 1:20, 1:20 +SPK 1:40, 1:40 +SPK 1:80, 1:80 +SPK 1:120, 1:120+SPK	La dilución que no presenta inhibición (o casi) (1/120) presenta unos valores de absorbancia próximos a cero, al ser demasiado diluida. Puede ser que el EDTA sea el causante de la inhibición.
Prueba 3	Muestras	Diluciones	Conclusiones
	Suero	1:10, 1:10+ SPK 1:20, 1:20 +SPK 1:50, 1:50 +SPK 1:100, 1:100 +SPK	Ninguna de las diluciones se evita la inhibición.

A pesar de todas las pruebas realizadas para el kit LAL de Lonza, no se consigue llegar a la dilución adecuada en la que no existe inhibición. Por tanto, aunque los datos obtenidos entran dentro de los normales para ese tipo de

muestras, el kit no termina de considerarse demasiado fiable para la determinación de endotoxina en muestras de sangre.

Entre los factores que pueden estar interviniendo en la correcta ejecución del ensayo, pueden encontrarse los siguientes, según el artículo de Anne Gnauck (30):

- **Método de recolección de las muestras de sangre**

Las bacterias y sus productos/componentes/fragmentos, como el LPS, son muy ubicuos. Esto hace necesario extremar las precauciones para evitar contaminaciones durante la toma de muestra, el procesado y la ejecución del experimento. Por ejemplo, los tubos donde se recoge la sangre, deben ser libres de endotoxinas, algo que presupuonemos, pero no hemos podido confirmar (tubos obtenidos del laboratorio Central del Hospital San Pedro). Además, el anticoagulante EDTA que se emplea para la obtención de plasma sanguíneo puede interferir directamente con el test, por lo que debería evitarse su uso.

- **Problemas con la preparación de muestras**

Los componentes del plasma y el suero podrían secuestrar o neutralizar a las endotoxinas, haciéndolas indetectables por el test LAL. Este secuestro podría estar mediado por la LBP la cual actúa por fuerzas electrostáticas entre la carga positiva de los grupos amino de su sitio de acción y las cargas negativas de los grupos fosfato del lípido A del LPS. Por ello, el LPS puede ser transferido de LBP al CD14 o al HDL o a otra lipoproteína como LDL o quilomicrones. El LPS podría también interactuar con anticuerpos específicos, entre su fracción inmunoglobulina, así como con otros péptidos antibacterianos como BPI (*bacterial permeability increasing protein*), cuyos sitios catiónicos interactúan con el lípido A. Además, otras células del sistema inmune innato, como los macrófagos podrían fagocitar y diacilar el LPS para eliminarlo. Así que la capacidad de neutralización de cada suero y plasma particular depende de la magnitud de estos agentes detoxificantes y de su potencial unión con el LPS. Esta capacidad de neutralización de endotoxina puede ser cuantificada determinando la proporción de una cantidad conocida de endotoxina que es lo que hemos estado denominando como muestras *spiked*.

Podrían utilizarse también tratamientos específicos de separación de complejos antígeno-anticuerpo, la manipulación del ambiente iónico o una digestión selectiva de las proteínas inmunes. En los últimos trabajos realizados al respecto se ha observado que la digestión de soluciones de complejos de endotoxina con Ig G por proteínasa K mejoran la recuperación de endotoxina, pero no se ha utilizado con suero o plasma. Nosotros no hemos llevado a cabo dichas pruebas, pero sería interesante valorarlo en un futuro próximo.

- **Problemas con la endotoxina**

A parte de las dificultades técnicas de cuantificar los niveles de endotoxina en sangre con el test LAL, hay otros problemas con la relación cuantitativa entre los niveles de endotoxina y los niveles de LPS en la muestra. El término endotoxina se refiere al potencial pro-inflamatorio de las moléculas de LPS. La endotoxicidad del LPS depende de la configuración química de su lípido A, que es identificado e interactúa con elementos del sistema inmune. La endotoxicidad de las moléculas de LPS varía considerablemente entre las especies gram-negativas que las producen. En este sentido, un metaanálisis de 45 estudios publicados entre 1970 y 2013 indicaron que la sensibilidad del test de endotoxina circulante en pacientes con infecciones bacterianas dependía de las especies de bacterias gram-negativas que causaban la infección. Además, parece que la sensibilidad del test es más alta para productos de las bacterias gram-negativas que se encuentran en el suelo y en el agua, como *Pseudomonas aeruginosa* que para las bacterias que se encuentran en el ser humano, como enterobacterias como *E. coli*. (30) El hecho de que la proporción de endotoxina contenida en una dosis dada de LPS varíe según la especie bacteriana, hace que nos cuestionemos las proporciones relativas de endotoxina que pueden ser detectadas por el test LAL y si también varía entre especies de las bacterias enterales. En este mismo sentido, el test LAL parece ser más sensible a moléculas de LPS que son menos endotóxicas para humanos.

Por último, la vida media del LPS circulante es corta y es rápidamente secuestrado por componentes bioactivos como el LBP. En realidad, el mismo mecanismo que ocurre *in vitro*, podría también ocurrir *in vivo*. Todo esto hace difícil relacionar los niveles de endotoxina circulante con los niveles de LPS

circulante. Todo ello pone en tela de juicio la idoneidad del empleo de este test en muestras humanas y su relevancia clínica.

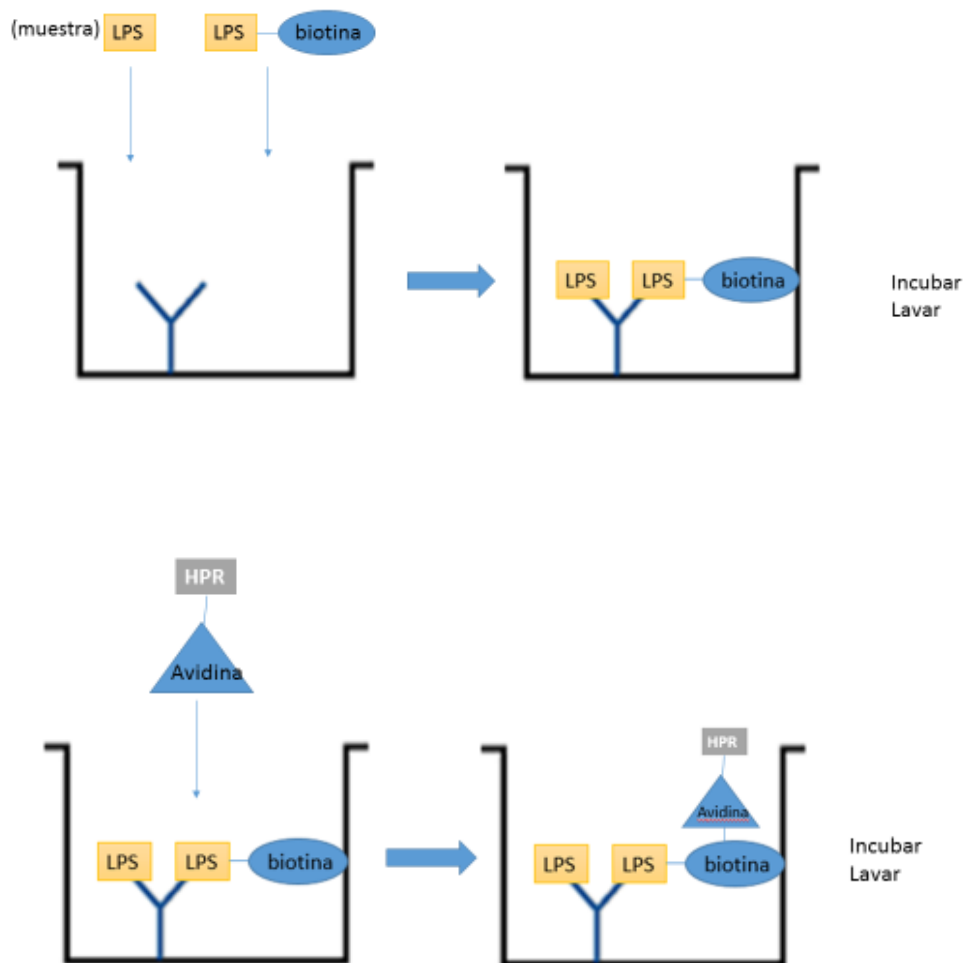
4.2. Puesta a punto del kit Cloud-Clone Corp CEB526Ge ELISA para LPS

4.2.1. Fundamento del kit

Se trata de un ELISA competitivo (inmunoensayo enzimático por inhibición competitiva) para la cuantificación de LPS en suero, plasma y otros fluidos biológicos. Brevemente se basa en un anticuerpo monoclonal específico para LPS que cubre el pocillo. La reacción de inhibición competitiva se desencadena entre LPS marcado con biotina y LPS sin marcar (estándares y muestras) con el anticuerpo específico para LPS.

Tras la incubación, el conjugado no unido es retirado por lavado. Después, se añade la avidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y se deja incubar. Esta enzima transforma el sustrato de color azul en un producto de color amarillo. La cantidad de conjugado de HRP unido es inversamente proporcional a la concentración de LPS en la muestra.

Por tanto, la intensidad de color generada será inversamente proporcional a la concentración de LPS en la muestra.



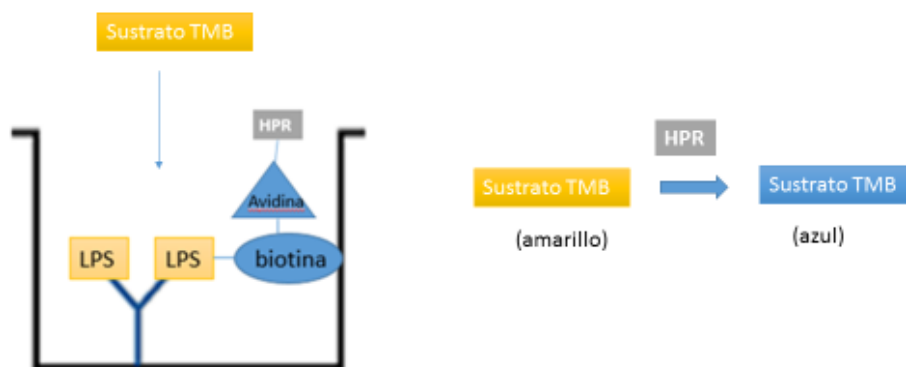


Ilustración 8. Reacción enzimática por inhibición competitiva.

4.2.2. Reactivos, equipamiento y condiciones de almacenaje

Los reactivos incluidos en el kit comercial son: una placa con 96 pocillos, dos viales de solución estándar, un vial de 120 ul de reactivo A, un vial de 120 ul de reactivo B, un vial de 9 ml de sustrato TMB (Tetrametilbencidina), un vial de 20 ml de solución de lavado (*Buffer*), cuatro tapas adhesivas, un vial de 20 ml de diluyente para la solución estándar, un vial de 12 ml de diluyente para el reactivo A, un vial de 12 ml de diluyente para el reactivo B y un vial de 6 ml de solución stop. En la tabla siguiente se resumen las condiciones de almacenaje:

Reactivos y materiales	Condiciones
Placa de 96 pocillos	Conservar a -20°C
Tapa	Conservar a 4°C
Estándar	Conservar a -20°C
Reactivo A	Conservar a -20°C
Reactivo B	Conservar a -20°C
Sustrato TMB	Conservar a 4°C
Wash Buffer	Conservar a 4°C
Solución Stop	Conservar a 4°C
Diluyente A	Conservar a 4°C
Diluyente B	Conservar a 4°C
Diluyente del estándar	Conservar a 4°C

Según el protocolo, es altamente recomendable utilizar los reactivos sobrantes del kit en el plazo de un mes, siempre que nos supere la fecha de caducidad del kit.

Además de lo incluido en el kit, se necesitan los siguientes materiales y reactivos:

- Micropipetas de 50ul, 100 ul, 1000 ul.
- Pipeta multicanal
- Puntas endotoxin-free
- Tubos tipo eppendorf
- Agua destilada
- Papel absorbente
- Bañeras
- Espectofotómetro capaz de leer longitudes de onda de 450 +- 10nm
- Humidificador

El lugar del experimento tiene que ser aséptico para evitar contaminación por endotoxina, y también debe permitir una humedad ambiental de al menos el 60%. Se decide que de todas las opciones existentes en el CIBIR, la más apropiada es la realización de esta técnica en una pequeña sala que se encuentra aislada por paredes de cristal, dentro del laboratorio común de la segunda planta. La mesa de trabajo será desinfectada con etanol antes de llevar a cabo el ensayo.



Ilustración 9. Sala aislada de la segunda planta del CIBIR.

4.2.3. Preparación de los reactivos

Es necesario llevar todos los componentes del kit a la temperatura de la sala (18-25°C), antes de su uso.

La solución estándar hay que reconstituirla con 0.5 ml del diluyente del estándar, y conservarlo durante 10 minutos a la temperatura ambiente de la sala, agitando sin formar espuma. La concentración de esta solución stock es de 1000 ng/mL. Para preparar las diferentes diluciones seriadas (1/3) se preparan 5 tubos conteniendo 0,6 mL de diluyente y se hacen las siguientes diluciones, transfiriendo 300 µL cada vez. Antes de cada transferencia hay que mezclar bien. Las diluciones seriadas no deben hacerse directamente en los pocillos:

Tubo	1 (Stock)	2	3	4	5
ng/mL	1 000	333,33	111,11	37,04	12,35

Los estándares deben prepararse 15 minutos antes del experimento.

Para los reactivos A y B se lleva a cabo un breve spin o centrifugación de los stock de cada uno de ellos, antes de ser usados. A continuación se diluyen 1:100 en sus respectivos diluyentes.

Se trata de reactivos bastante pegajosos, por lo que hay que pipetear lentamente para reducir errores. Es importante evitar espumas y mezclar bien hasta que todos los cristales estén completamente disueltos.

Para preparar la solución de lavado, hay que diluir 20 ml de la solución de lavado concentrada con 580 ml de agua destilada, obteniéndose un volumen total de 600 ml. Si se forman cristales en la solución de lavado concentrada, atemperar a la temperatura de la sala y mezclar bien hasta que los cristales se disuelvan completamente.

El Sustrato TMB se manipula aspirando la dosis necesaria, sin volver a verter al vial de nuevo, para evitar contaminaciones.

4.2.4. Preparación de las muestras

El protocolo indica que se debe recolectar el plasma utilizando EDTA como anticoagulante a 1000xg.

Las muestras de plasma que se van a utilizar en los 5 días siguientes de su recolección pueden ser almacenadas a 4°C. Si van a estar almacenadas menos de un mes, se conservarán a -20°C y si son dos meses a -80°C, para evitar la pérdida de bioactividad y contaminación. En nuestro caso, las muestras de sangre estaban ya recogidas desde hace meses y guardadas a -80°C.

Las muestras hemolizadas pueden influir en el resultado, por tanto, no deberían detectarse especies hemolíticas.

Para poner a punto el test es necesario llevar a cabo varias pruebas con el fin de dar con la dilución de la muestra más apropiada que de un valor de LPS dentro del rango que detecta el kit. Las muestras se diluyen con PBS a concentración de 0.01 mol/L (pH: 7.0-7.2). Para ello, se preparan muestras humanas de plasma EDTA a diferentes diluciones y por duplicado.

4.2.5. Detalles del procedimiento

Los pasos a seguir son los siguientes:

-Añadir 50 ul de cada una de las diluciones de los estándares, 50 ul del blanco (diluyente de los estándares) y 50 ul de las muestras en cada pocillo, respectivamente, en la placa del kit.

-Añadir 50 ul del reactivo A a cada pocillo. (Si el reactivo A está turbio: atemperar a la temperatura de la sala y mezclar hasta que la solución sea uniforme).

-Agitar la placa.

-Cubrir con la tapa

-Incubar durante 1 hora a 37°C en un horno Pasteur.

-Aspirar cada solución y lavar con 350 ul de solución lavado (preparada), durante 1-2 minutos.

-Retirar el líquido remanente de todos los pocillos de la placa con papel absorbente. Repetir 3 veces.

-Tras el último lavado, retirar toda la solución de lavado por aspiración o por decantación.

-Invertir la placa y secarla con papel absorbente.

-Añadir 100ul de Reactivo B a cada pocillo.

-Tapar la placa.

-Incubar durante 30 minutos a 37°C.

-Repetir el paso 2 entero, 5 veces.

-Añadir 90 ul de sustrato a cada pocillo.

-Tapar la placa.

-Incubar durante 15-25 minutos a 37°C (no más de 30 minutos). Proteger de la luz.

-El líquido se volverá azul por la adición del sustrato.

-Añadir 50 ul de solución stop a cada pocillo.

-El líquido se volverá amarillo por la adición de la solución stop.

-Tapar la placa y mezclar.

-Si el color no es uniforme, tapar y mezclar mejor.

-Retirar cada gota de agua y huellas de la parte inferior de la placa y confirmar que no hay burbujas en la superficie del líquido.

-Leer la placa a 450 nm, inmediatamente.

En este procedimiento es importante tener en cuenta lo siguiente:

- Usar estándares frescos.
- No formar espuma.
- No tocar la pared de los pocillos.
- Para cada paso, no exceder más de 10 minutos del tiempo que marca el procedimiento. Esto es para asegurar que transcurre el mismo tiempo en cada pipeteo, sin interrupción.
- Duplicar todos los estándares y muestras.
- Evitar contaminación cruzada: cambiar las puntas...
- Que la placa esté bien sellada durante la incubación. No dejar los pocillos al descubierto durante mucho tiempo entre incubación e incubación. No dejar que se sequen. Controlar bien el tiempo y la temperatura.
- El lavado es un paso crítico. Retirar completamente el líquido en cada paso es esencial. Después del último lavado, retirar toda la solución de lavado (*Wash*) por aspiración o decantación y eliminar las gotas de agua y las marcas de la base de la placa. Un lavado insuficiente dará resultados imprecisos y una absorbancia más elevada de la real.
- Es importante controlar los tiempos de reacción. Observar el cambio de color tras añadir el sustrato TMB (observar una vez cada 10 minutos). Si el color es muy oscuro, añadir la solución stop antes de evitar una reacción excesivamente fuerte que daría una lectura incorrecta de la absorbancia.
- El sustrato TMB es fácilmente contaminable. Proteger de la luz.
- La humedad menor al 60% podría tener efectos en el experimento. Es recomendable usar un humidificador y controlar dicho parámetro.

El experimento emplea un inmunoensayo de inhibición competitiva, por lo que es una correlación inversa entre la concentración de LPS de la muestra y la intensidad de la señal.

Para obtener la concentración de LPS hay que hacer el promedio de los duplicados: estándar, controles y muestras. A partir de los estándares, hay que crear una curva estándar: log-log o semilog: log de la concentración de LPS en

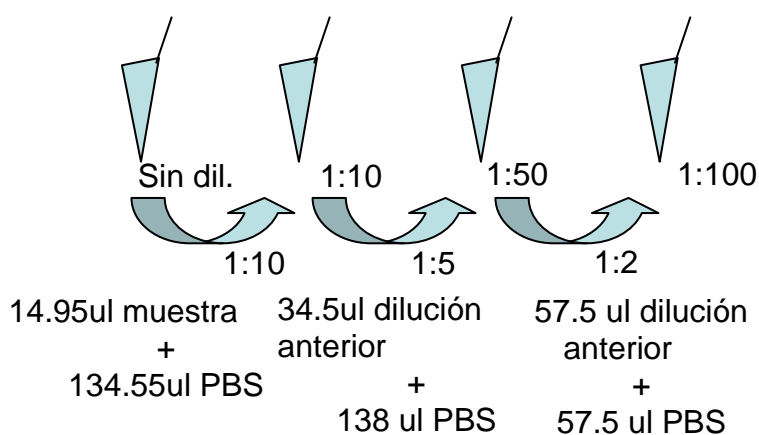
el eje Y y absorbancia en el eje X. A continuación, hay que dibujar la mejor línea a través de los puntos estándar para determinar la regresión.

Si las muestras han sido diluidas, la concentración leída en la curva estándar deberá ser multiplicada por el factor de dilución para obtener la concentración final de LPS.

4.2.6. Pruebas realizadas y conclusiones obtenidas

Prueba 1

-Muestras: plasma EDTA A y B a diluciones 1:10, 1:50 y 1:100:



-Plantilla de la placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	333.33	A 1:100									
B												
C	12.35	1.000	B 1:10									
D												
E	37.04	A 1:10	B 1:50									
F												
G	111.11	A 1:50	B 1:100									
H												

-Resultados:

Estándar	Concentración de LPS teórica (ng/ml)	Concentración de LPS (ng/ml)
Blanco	0	1
1	12,35	19,4980467
2	37,04	32,5078612
3	111,11	68,4262186
4	333,33	209,495343
5	1000	1865,24615

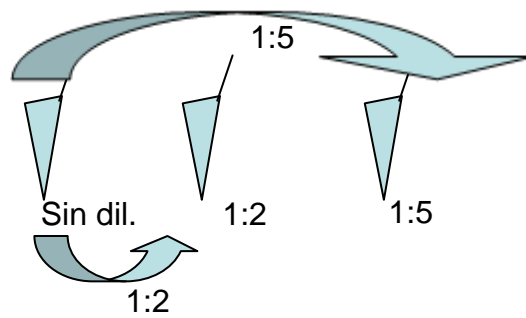
Muestra	Dilución	Concentración de LPS (ng/ml)
A	1:10	16,9820506
	1:50	13,0519017
	1:100	8,76576781
B	1:10	11,041782
	1:50	7,73587133
	1:100	6,68757873

A la vista de los resultados obtenidos, se decide probar con muestras menos diluidas, ya que los datos no se encuentran bien centrados en la curva patrón (la mayoría no alcanzan la concentración del menor de los estándares) y por tanto, carecen de fiabilidad. Las concentraciones medidas de los estándares más concentrados se encuentran bastante alejadas de las que teóricamente se deberían haber obtenido. Al tratarse de un cálculo inverso (a mayor absorbancia menor concentración de LPS), podría ser que hubiera sido adecuado parar la reacción antes de alcanzar un color tan marcado, como se indica en el manual. Por ello, otro factor a estudiar es el tiempo de incubación por tratarse de un punto crítico según el manual del kit.

Prueba 2

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la prueba 1, se decide llevar a cabo una nueva prueba, utilizando en vez de un incubador, un Horno Pasteur. Se ensaya con muestras de plasma EDTA, una almacenada desde hace dos años y otra muestra reciente por valorar también si un tiempo muy prolongado de almacenaje puede afectar a los resultados. Por último, como el rango de tiempo de incubación con el sustrato es amplio, se realizará una prueba, dejando un tiempo de incubación de 9 minutos y otra de 15 minutos.

-Muestras: plasma EDTA A y B a diluciones 1:2, y 1:5:



115ul
muestra
+
115ul
PBS

46ul
muestra
+
184 ul
PBS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	333.33	A									
B			1/5									
C	12.35	1.000	B									
D			sin dil									
E	37.04	A	A									
F		sin dil	½									
G	111.11	A	A									
H		1/2	1/5									

-Plantilla de la placa:

-Resultados:

Tiempo de incubación: 9 min.		
Están dar	Concentrac ión de LPS teórica	Concentración de LPS (ng/ml)
Blanc o	0	0
1	12,35	14,9369739
2	37,04	29,467171
3	111,11	99,1784379
4	333,33	387,913783
5	1000	723,155668

Tiempo de incubación: 9 min		
Muestra	Dilución	Concentración de LPS (ng/ml)
A (antigua)	Sin diluir	438,675
	1:2	186,421
	1:5	39,717
B (fresca)	Sin diluir	429,720
	1:2	268,361
	1:5	20,908

Tiempo de incubación: 15 min.		
Están dar	Concentración de LPS teórica	Concentración de LPS (ng/ml)
Blanco	0	0,851
1	12,35	11,623
2	37,04	46,462
3	111,11	133,361
4	333,33	430,112
5	1000	647,332

Tiempo de incubación: 15 min		
Muestra	Dilución	Concentración de LPS (ng/ml)
A (antigua)	Sin diluir	303,481
	1:2	238,312
	1:5	16,432
B (fresca)	Sin diluir	278,295
	1:2	147,641
	1:5	11,432

De las tres opciones, y tal y como se muestra en los resultados obtenidos se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

-la dilución más adecuada es 1:5, ya que son los más centrados en la curva patrón.

-el tiempo de incubación con el que se obtienen mejores resultados es de 9 minutos.

-no se aprecian diferencias relevantes entre las muestra más antigua y la más reciente.

Prueba 3

En la anterior prueba, se ha visto que la dilución más adecuada al kit es la de 1:5. En esta prueba se compararán los resultados obtenidos entre muestras de suero y de plasma EDTA a la misma dilución.

-Muestras: suero y plasma EDTA A, y suero y plasma EDTA B a 1:5.

-Plantilla de la placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	333.33	B-suero 1:5	B-Plasma EDTA 1:5								
B												
C	12.35	1.000	B-suero 1:5 +50ng/ml	B-Plasma EDTA 1:5 +50ng/ml								
D												
E	37.04	A-suero 1:5	A-Plasma EDTA 1:5									
F												
G	111.11	A-suero 1:5 +50ng/ml	A-Plasma EDTA 1:5 +50ng/ml									
H												

-Resultados:

Tiempo de incubación: 9 min.		
Estándar	Concentración de LPS teórica	Concentración de LPS (ng/ml)
Blanco	0	1,33
1	12,35	7,20
2	37,04	39,84
3	111,11	141,13
4	333,33	368,87
5	1000	853,77

Tiempo de incubación: 9 min.		
Muestra	Tipo	Concentración de LPS (ng/ml)
A	Suero	59,87
	Plasma EDTA	10,24
B	Suero	55,51
	Plasma EDTA	26,34

En esta prueba se aprecia que los valores obtenidos con las muestras de plasma son inferiores a los obtenidos con las muestras de suero.

En la tabla siguiente se muestran agrupadas las pruebas realizadas con el kit de Cloud-Clone:

Kit Cloud-Clone CEB526Ge			
Prueba 1	Muestras	Diluciones	Conclusiones
	Plasma	1:10	Las diluciones son demasiado altas, dando resultados de concentración demasiado bajos para el rango que acepta el kit.
	EDTA	1:50	
	1:100		
Prueba 2	Muestras	Diluciones	Conclusiones
	Plasma	Sin diluir	Los resultados que más se adaptan al rango del kit son los obtenidos a dilución 1:5 y con un tiempo de incubación de 9 min. Tanto la muestra antigua como la fresca dan resultados aceptables, por lo que el tiempo de conservación de la muestra no se considera un factor relevante para el test.
	EDTA	1:2	
	(muestra antigua y muestra fresca)	1:5	
		Condiciones	
	t de incubación: 9 min 15 min		
Prueba 3	Muestras	Diluciones	Conclusiones
	Plasma	1:5	Los valores de concentración de LPS obtenidos con las muestras de plasma son inferiores a los obtenidos con las muestras de suero.
	EDTA		
Suero			

El kit Cloud-Clone presenta una puesta a punto más sencilla que el LAL de Lonza; lo que resulta ventajoso a la hora de cometer errores de ejecución. Además, el propio kit está creado para la determinación de LPS en muestras biológicas, a diferencia del de Lonza, que determina endotoxina. De esta forma, una vez ajustadas las condiciones del ensayo, el kit de Cloud-clone parece ser más adecuado para este estudio que el kit de Lonza. Estudios en muestras humanas avalan además su uso.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se decidió que los experimentos finales en las muestras de pacientes infectados por el VIH se llevaran a cabo con el kit de Cloud-Clone. Se realizó un experimento con los sueros y otro con los plasmas EDTA de las mismas muestras a estudio.

Los resultados de los sueros son menos variables entre sí que los de los plasmas, sin embargo, es interesante llevar a cabo ambos ensayos para poder comparar con anteriores estudios.

4.3.Comparación de resultados entre ambos kits.

Cabe destacar que los resultados absolutos obtenidos con el kit de Cloud-Clone son bastante más elevados que los obtenidos mediante el kit de Lonza, teniendo en cuenta que 1 EU/ml (unidades del kit de Lonza) equivale aproximadamente a 0,1 ng/ml (unidades del kit de Cloud-Clone). Esto podría explicarse por el fenómeno de la inhibición que puede tener lugar en el kit de Lonza, ya que puede dar lugar a resultados de concentración de endotoxina menores a los reales. Por otro lado, es complicado comparar los resultados obtenidos mediante ambos kits, ya que el de Lonza es capaz de detectar endotoxina; a diferencia del kit de Cloud-Clone, que detecta únicamente LPS.

En primer lugar, la endotoxina es un producto bacteriano y como tal, es muy ubicua. El hecho de haber llevado a cabo el experimento de Lonza en una campana de la sala de cultivos bacterianos, podría estar contaminando el experimento aunque en teoría no debería ser así. Si que es importante tener en cuenta que durante las pruebas, se han llevado a cabo muchas diluciones de varias muestras. Durante este proceso también existe la posibilidad de contaminación, que en caso de ser así, al ser diluciones seriadas, se arrastra el error a todas las medidas. Igualmente, otro punto crítico podría ser la toma y

conservación de las muestras. Puede que en alguna parte del proceso exista contaminación por endotoxina, lo que daría como resultado niveles más elevados de lo considerado normal. Todo esto son hipótesis, porque no hemos podido comprobar, por la limitación de tiempo, ninguna de ellas.

4.4. Estudio de concentración de LPS en muestras de pacientes VIH

Tras llevar a cabo todas las pruebas, y en vista de los resultados obtenidos en ellas, se decidió llevar a cabo el experimento final con todas las muestras de pacientes VIH de la cohorte del Departamento de Enfermedades Infecciosas del CIBIR-Hospital San Pedro empleando para ello el kit Cloud-Clone. Se analizaron muestras tanto de suero como de plasma EDTA. Algunos de los pacientes infectados por el VIH presentaban síndrome metabólico. También se analizaron una pequeña muestra de individuos sanos que sirven de grupo control para poder hacer comparaciones como en estudios previos ya publicados.

4.4.1. Experimento 1: estudio en muestras de plasma EDTA

Se cuantificaron un total de 74 muestras diluidas 1:5, de las cuales solo dos (la 2 y la 91) se duplicaron como control interno del buen funcionamiento del kit.

Durante el experimento, se alcanzó una humedad de 53% y una temperatura ambiental de 22,7 °C.

- Plantilla de la placa empleada para este estudio:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Blanco	Estándar 4	5	18	27	38	46	55	64	75	85
B		Blanco	Estándar 4	6	19	28	39	47	56	65	77	86
C		Estándar 1	Estándar 5	7	20	29	40	48	57	66	79	87
D		Estándar 1	Estándar 5	10	21	30	41	49	58	67	80	88
E		Estándar 2	2	12	22	31	42	50	60	70	81	89
F		Estándar 2	2	13	23	35	43	51	61	72	82	90
G		Estándar 3	3	15	24	36	44	53	62	73	83	91
H		Estándar 3	4	16	25	37	45	54	63	74	84	91

Los valores de absorbancia obtenidos con las muestras que son empleadas para hacer la recta patrón son los siguientes:

Estándar	DO a 450 nm	Promedio
0	3,225	3,5435
	3,862	
12,35	1,8484	1,8472
	1,846	
37,04	1,2236	1,27395
	1,3243	
111,11	0,7072	0,71125
	0,7153	
333,33	0,3044	0,2811
	0,2578	
1000,00	0,1837	0,17795
	0,1722	

Estos valores se representaron gráficamente y se calcularon los logaritmos en base 10 de las concentraciones de los estándares (conocidas) frente a los promedios de las densidades ópticas. Se obtuvo la siguiente curva con su correspondiente ecuación:

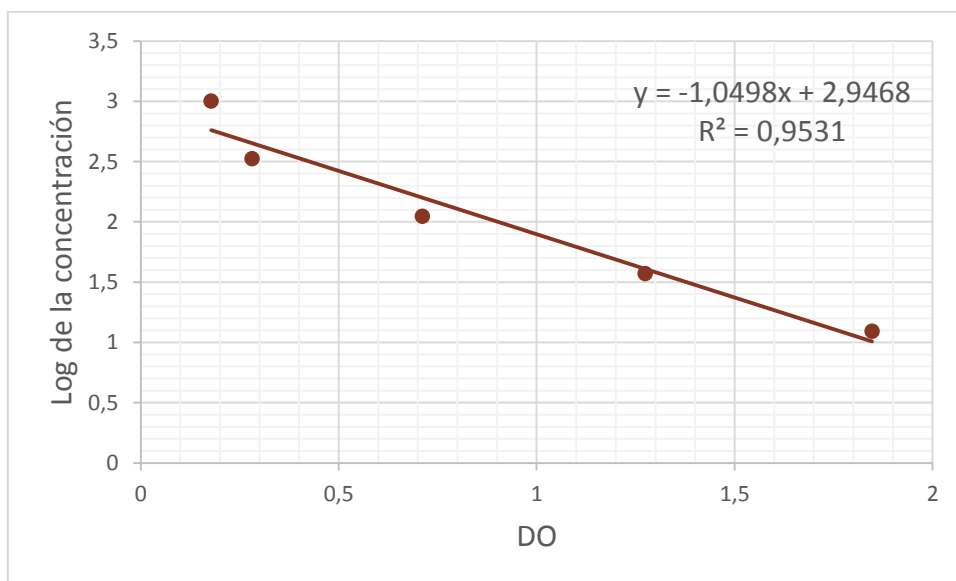


Ilustración 10. Recta patrón log de la concentración de endotoxina vs densidad óptica.

Con la ecuación calculada, se pudieron obtener los valores de logaritmo en base 10 de cada una de las muestras analizadas. Se calculó la Y de cada uno de los datos de densidad óptica o X. Posteriormente, se calculó el

antilogaritmo de Y, que es la concentración de LPS y se multiplicó por el factor de dilución (1:5).

Teniendo en cuenta esta curva patrón, se interpolaron el resto de densidades ópticas medidas y se obtuvieron las concentraciones de LPS en plasma. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

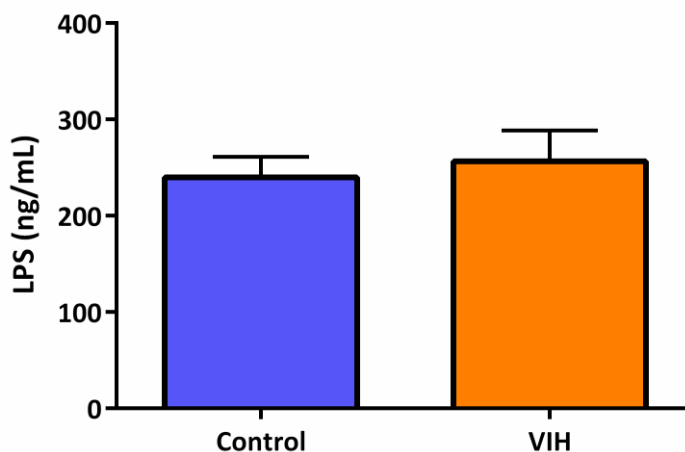


Ilustración 11. Gráfica de promedios de las concentraciones de LPS en plasma EDTA de controles y pacientes VIH.

Como era de esperar, los niveles plasmáticos de LPS fueron mayores en los pacientes VIH en comparación con la población control, lo cual podría sugerir una mayor translocación bacteriana inducida por la infección por el VIH aunque sin diferencias significativas entre ambos grupos (valorado con el test estadístico no paramétrico U Mann-Whitney mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism®, La Jolla, California, EEUU)).

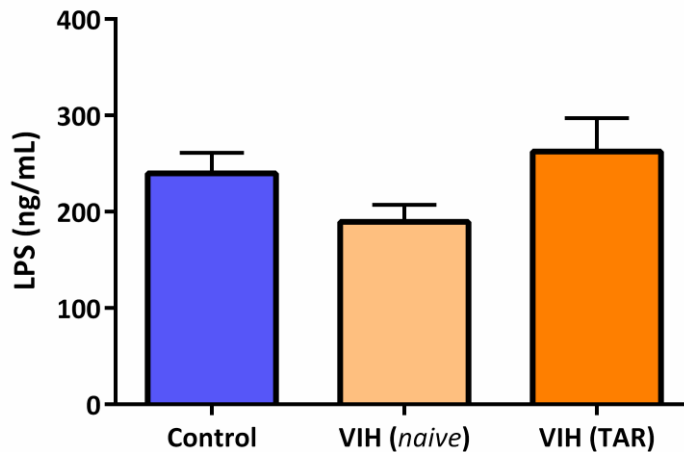


Ilustración 12. Gráfica de promedios de las concentraciones de LPS en plasma EDTA de controles, pacientes infectados por el VIH sin tratamiento antirretroviral previo (naïve) y pacientes VIH bajo tratamiento antirretroviral (TAR).

Al comparar los promedios de las concentraciones de LPS obtenidas en las muestras de pacientes Naïve frente a los de controles sanos, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (valorado con el test estadístico no paramétrico Kruskal–Wallis seguido del post-test de Dunns mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism®, La Jolla, California, EEUU)).

4.4.2. Experimento 2: Estudio de muestras de suero humanas

De forma similar a la determinación anterior, al llevar a cabo este experimento, se alcanzó una humedad de 53% y una temperatura ambiental de 22,5°C.

Plantilla de la placa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Blanco	Estándar 4	5	18	27	38	46	55	64	75	85
B		Blanco	Estándar 4	6	19	28	39	47	56	65	77	86
C		Estándar 1	Estándar 5	7	20	29	40	48	57	66	79	87
D		Estándar 1	Estándar 5	10	21	30	41	49	58	67	80	88
E		Estándar 2	2	12	22	31	42	50	60	70	81	89
F		Estándar 2	2	13	23	35	43	51	61	72	82	90

G	Estándar 3	3	15	24	36	44	53	62	73	83	91
H	Estándar 3	4	16	25	37	45	54	63	74	84	91

Leve hemólisis
Muestra hemolizada

En el protocolo del kit se explica que los cálculos se harán en base a la curva patrón que mejor se aproxime a los datos teóricos. Se realizaron los cálculos y se dibujó la gráfica, utilizando el programa Excel. Se obtuvo la siguiente gráfica y su correspondiente ecuación:

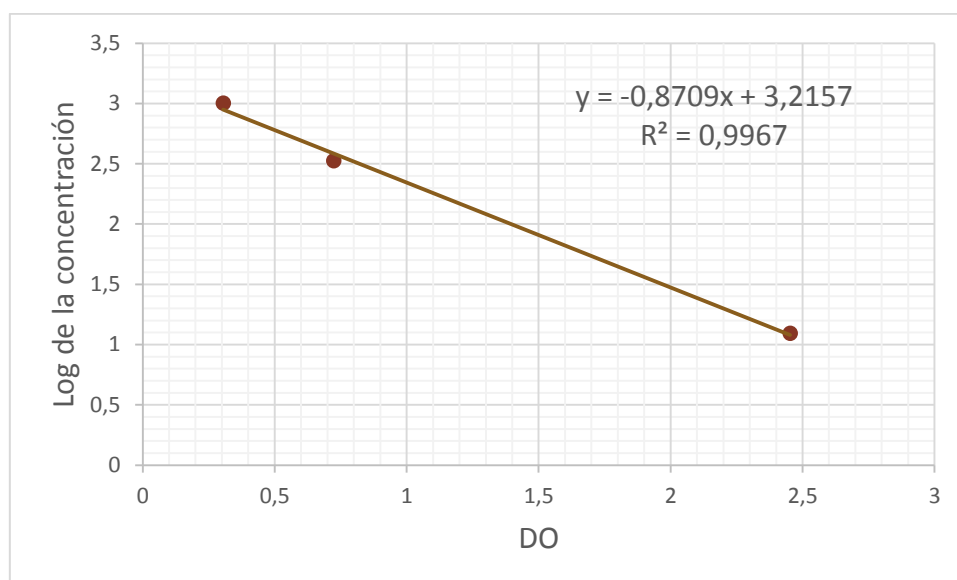


Ilustración 13. Recta patrón log de la concentración de LPS vs densidad óptica.

En este caso, al trazar la recta patrón, se observó que había dos puntos que se alejaban de la tendencia del resto de puntos. Por ello, se decidió suprimir esos puntos y no tenerlos en cuenta en la recta para así poder obtener una recta más ajustada, tal y como se muestra en la figura anterior.

Como en el experimento anterior, se hicieron los cálculos de las concentraciones de LPS, obteniéndose los resultados expuestos en las siguientes gráficas:

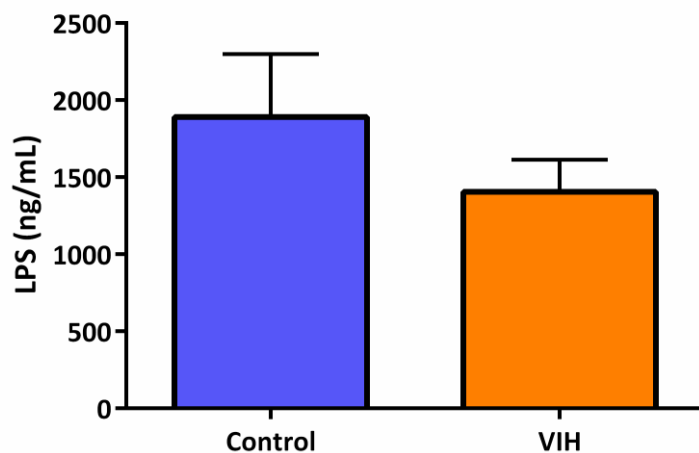


Ilustración 14. Gráfica de promedios de la concentración de LPS en suero en controles y pacientes VIH.

En este caso, y en contraposición con lo esperado, los valores de la concentración de LPS son mayores en las muestras de controles sanos que en las muestras de pacientes VIH aunque sin diferencias significativas (valorado con el test estadístico no paramétrico U Mann-Whitney mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism®, La Jolla, California, EEUU)).

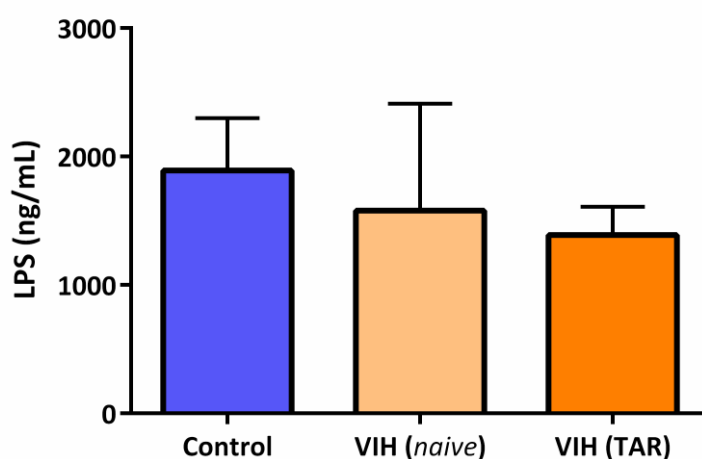


Ilustración 15. Gráfica de promedios de las concentraciones LPS en suero en controles, pacientes infectados por el VIH sin tratamiento antirretroviral previo (naïve) y pacientes VIH bajo tratamiento antirretroviral (TAR).

Al separar el grupo VIH respecto a si llevan o no tratamiento, se observan valores mayores de concentración de LPS en los pacientes naïve que en los pacientes que han recibido tratamiento aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (valorado con el test estadístico no paramétrico Kruskal–Wallis seguido del post-test de Dunns mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism®, La Jolla, California, EEUU)).

4.4.3. Comparación de resultados entre muestras de suero y plasma con el kit Cloud-Clone.

En las muestras de plasma EDTA se obtienen concentraciones mucho menores que en las muestras de suero. Esto podría explicarse con la existencia de proteínas plasmáticas que pueden interferir la reacción como se observó en el caso del kit LAL de Lonza. Algunos autores para evitar esto, además de diluir las muestras, las someten a un precalentamiento para inactivar a estas proteínas (33). Sin embargo, las instrucciones del kit Cloud-Clone no hacen mención a tal posibilidad ni mencionan la necesidad de pre-tratar las muestras antes de su valoración. De hecho, en el protocolo de kit de Cloud-Clone, únicamente se da importancia a la frescura de las muestras (su correcta conservación según el momento de recogida). Si se menciona que es mejor evitar en la medida de lo posible repetir ciclos de congelaciones y descongelaciones. Las muestras utilizadas en este experimento llevan congeladas más de dos años, por lo que esto podría ser un punto crítico que puede haber interferido en los resultados de la medida. Sin embargo, este aspecto afectaría tanto a las muestras de suero como de plasma, y a todas por igual. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una prueba, como se ha señalado anteriormente, en la que se analizó una muestra reciente (recogida la semana anterior) y una de estas características (recogidas hace 2 años). Los resultados, sin embargo, no mostraron grandes diferencias significativas, por lo que esta variable quedaría descartada.

Además, las condiciones de temperatura y humedad del kit Cloud-Clone han podido ser diferentes de unas pruebas a otras, e incluso, entre éstas y el experimento final llevado a cabo con todas las muestras, pudiendo influir en los resultados. Las condiciones fueron sin embargo anotadas y no se han observado grandes diferencias.

Independientemente de los posibles errores, la puesta a punto del kit de Cloud-Clone resulta mucho más manejable y por tanto, es más reproducible que el kit LAL de Lonza, ya que no hay tantas interferencias y la probabilidad de contaminación parece ser menor, aunque solo sea por la mayor simplicidad del experimento.

Por otro lado, es curioso haber obtenido diferentes patrones al analizar el LPS en muestras de suero y en muestras de plasma recogidas de los mismos pacientes. Basándonos en la literatura científica, los resultados de los niveles de endotoxina y/o LPS en sangre en pacientes VIH con respecto a controles-no infectados son mayores. El descenso observado al analizar las muestras de suero es curioso y no tenemos una explicación para ello. No creemos que sea debido a problemas con la realización de la técnica, pero, hasta el momento no podemos explicarlo.

De todas formas, la diferencia de resultados obtenidos entre un kit y otro y también las diferencias obtenidas dentro del mismo kit con diferentes muestras, nos lleva a sugerir y corroborar nuestra hipótesis inicial de que el LPS no es un marcador fiable para cuantificar la translocación bacteriana ya que es difícil su estandarización y comparación con otros estudios.

5. Estudio comparativo con otros marcadores de translocación bacteriana

Los resultados obtenidos de concentración de LPS fueron comparados con otros de marcadores de translocación bacteriana publicados en la bibliografía científica del campo y que fueron medidos en las mismas muestras sanguíneas.

Estos marcadores fueron los niveles de sCD14, I-FABP y LBP se midieron mediante la técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los kits de sCD14 e I-FABP son de R&D (Minneapolis, EEUU), mientras que el kit de LBP es de Hycult Biotech (Uden, Holanda).

En la tabla siguiente, se exponen todos los datos:

Muestra (ID)	Plasma LPS (cloud)	Suero LPS (Cloud)	Suero sCD14 ng/ml	Plasma LBP µg/ml	Plasma I-FABP pg/ml
2	125,6318238	312,212171	2034,37	23,63	1464,78
3	102,0755772	1100,72757	1609,09	17,47	4242,38
4	46,47420232	2248,05708	2691,41	11,17	897,31
5	100,2416818	108,851752	3437,40	20,80	3603,66
6	313,8801882	176,597111	2900,55	17,18	5572,50
7	139,9331931	166,988085	1590,85	21,90	3269,76
10	106,0495144	190,503787	2503,11	11,23	2145,43
12	144,4003162	219,037389	2586,60	28,05	3862,83
13	606,9450088	4058,5834	2530,06	28,57	1775,78
15	130,1133217	2073,113	1293,99	10,83	1298,40
16	261,1404357	3527,04885	3349,50	29,94	1057,28
18	50,21177156	86,5375239	2387,15	13,66	1226,11
19	103,9430232	324,695242	1697,38	14,13	
20	61,99377808	68,2069507	2319,69	33,33	3925,71
21	72,87519407	248,633208	2151,20	19,50	3150,57
22	422,8674378	846,601501	3417,67	23,15	2265,42
23	142,2523286	788,744356	3137,11	28,23	1972,66
24	138,8885246	1078,87429	4555,09	27,40	
26	90,84927886	2283,95448	2589,98	21,41	2142,12
27	53,6889616	185,341334	2581,84	15,84	
28	158,2543164	189,171394	2218,61	19,09	
29	147,3979503	217,374619	2028,91	18,40	2780,68
30	286,4022888	408,829602	2369,35	23,74	3603,55
31	172,5593135	614,11251			
35	228,9628405	1068,32511			
36	142,0118301	2259,80869	2487,12	14,65	2898,84
37	113,695408	2715,47691	2116,80	27,50	2156,65
38	93,70417133	384,651096	2548,96	17,55	1377,63
39	263,5502086	432,701902	3313,45	14,56	2385,67
40	725,127915	1077,36091	2215,03	14,21	3578,52
41	150,5305694	576,63591			
42	423,8908522	1746,11939	2559,94	4,53	3480,08
43	521,2090456	3441,11672	3413,47	27,54	3268,23

44	170,527484	3161,89486	1608,53	20,40	1133,85
45	267,5944516	4125,0457	1941,24	11,37	2075,50
46	207,0586244	755,763815			2422,76
47	240,1298029	334,007035	2697,31	21,27	1155,99
48	512,2162878	639,242946	2731,37	29,83	3331,57
49	351,8150909	535,185335	1773,50	13,39	834,17
50	182,7778836	1520,78887	2375,00	19,97	1061,92
51	984,7348417	2035,62504	2659,38	19,89	
53	127,8993049	2719,83673	1721,99	18,84	1159,49
54	290,5161662	3857,80884	2568,80	10,36	1028,86
55	159,3675824	354,93096	2285,49	15,04	1326,02
56	298,4166731	736,168625	2380,56	20,14	1475,80
57	131,7591318	371,386595	2588,39	8,00	6677,78
58	202,6026513	541,663541	2976,32	12,25	
60	192,7144431	1027,14982	0,48	9,18	1954,21
61	373,0994461	2999,45779	2377,37	14,20	5529,44
62	741,7930232	5202,25809	2677,20	27,14	
63	853,6426873	5490,59113	2288,39	13,07	1406,39
64	73,61882547	412,783809	1492,55	10,18	1151,40
65	342,6664966	698,769442	2412,85	10,01	1201,45
66	324,5272311	463,140025	1614,47	10,71	809,29
67	285,5037023	985,780775	2338,19	15,11	1300,39
70	259,5670876	1632,99883	1934,18	20,38	825,70
72	290,5863998	3386,35282	2797,24	29,72	3153,62
73	782,8765496	5917,02868	5048,71	35,69	2683,57
74	206,5087911	4052,07761			
75	107,9374675	682,291867	1371,92	12,87	1547,48
77	222,6856872	603,24945	1471,74	20,31	1074,99
79	192,6212977	482,382545	2135,65	14,78	5342,85
80	271,8321401	1568,80106	2268,45	24,31	2784,48
81	260,7619646	2244,45351	5609,58	30,24	
82	244,8778166	3623,83674	5770,06	11,91	1744,28
83	239,8977332	4257,83654	1645,62	9,82	2013,88
84	287,0954332	3715,82177	1338,23	11,61	1976,51
85	105,334162	560,784723	3177,58	5,41	3791,56
86	42,27268022	346,561388	3733,62	23,44	4661,39
87	109,276356	357,072648	1702,80	15,13	2353,91
88	106,4090104	564,281698	1881,61	12,99	1722,05
89	149,5513178	1590,34004	2217,58	15,17	2510,08
90	167,4233025	3659,62035	1176,20	15,81	1734,19
91	180,9534945	3469,17773	1084,25	22,21	1717,13

Se realizaron las correlaciones de todos los datos expuestos. Los datos obtenidos mediante el kit CCloud-Clone del LPS en plasma se asociaron

positivamente con los medidos con el mismo kit en suero ($r=0,493$, $p<0,001$), sugiriendo que ambas determinaciones se relacionan y podrían usarse indistintamente (aunque como hemos señalado anteriormente, al hacer la separación por grupos los perfiles eran diferentes en muchos casos). Sin embargo, ninguno de las dos determinaciones de LPS se asoció con los otros marcadores medidos.

Por otro lado, es interesante señalar que los niveles séricos de sCD14 se correlacionaron positivamente con los marcadores LBP e I-FABP en plasma ($r=0,332$, $p=0,005$ para LBP; $r=0,300$, $p=0,019$ para I-FABP) respectivamente. Es decir, que los tres marcadores de translocación bacteriana medidos a parte del LPS parecen estar relacionados entre sí, mientras que el LPS medido con el kit Cloud-Clone es independiente y no se asocia con los anteriores.

6. Conclusiones

- El kit de Lonza para la cuantificación de endotoxinas en muestras humanas exige unas condiciones de ejecución, sobre todo para evitar la inhibición, que no hemos podido cubrir en nuestro estudio de forma satisfactoria.
- La puesta a punto del kit de Cloud-Clone permite trabajar con fiabilidad con muestras tanto de plasma-EDTA como de suero a una dilución de 1:5 y bajo las siguientes condiciones:
 - tiempo de incubación: 9 minutos
 - humedad: en torno al 50%
 - temperatura: en torno a los 22 °C
- En el experimento realizado mediante el kit Cloud-Clone, los valores de concentración de LPS obtenidos en muestras de suero fueron bastante mayores a los obtenidos en muestras de plasma. Los perfiles obtenidos al separar las muestras atendiendo al tratamiento resultaron también diferentes en función del tipo de muestra analizado. Esto pone de relieve que el LPS no parece ser un marcador fiable para cuantificar la translocación bacteriana en este tipo de muestras, ya que es difícil su estandarización y comparación con otros estudios.
- La cuantificación de LPS con el kit Cloud-Clone no se asoció con los resultados obtenidos con otros marcadores de translocación bacteriana, corroborando su falta de fiabilidad.

En resumen, nuestro estudio sugiere que para cuantificar la translocación bacteriana como paso previo a poder modularla y, por tanto, mejorar diferentes patologías, el LPS no es un buen marcador, al menos con los kits existentes actualmente en el mercado. Sin embargo, otros marcadores también propuestos como marcadores de translocación bacteriana parecen ser más consistentes.

Según nuestro punto de vista, para llevar a cabo un estudio fiable del estado de la translocación bacteriana intestinal en pacientes VIH, siempre es mejor comparar varios de estos marcadores (con la excepción del LPS) y así poder obtener resultados más adecuados a la realidad.

7. Bibliografía

1. *HIV infection and the gastrointestinal immune system.* **Douek, JM Brenchley and DC.** 2008, Nature.
2. **Pérez-Matute P, Villanueva-Millán MJ, Oteo JA.** "Cambios en el microbioma en VIH/SIDA", dentro del libro *Microbioma, Disbiosis, Probióticos y Baceterioterapia.* s.l. : Manole, Brasil, 2016.
3. *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice.* **Caní PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R.** 57:1470-148118, s.l. : Diabetes, 2008.
4. *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia.* **Caní PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, Gibson GR, Delzenne NM.** 50:2374-2383, s.l. : Diabetologia, 2007.
5. *Microbial translocation across the GI tract.* **Brenchley JM, Douek DC.** 30: 149-73, s.l. : Annu Rev Immunol., 2012.
6. *Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity.* **Caní PD, Osto M, Geurts L, Everard A.** Jul-Aug, 3(4): 279-88, s.l. : Gut Microbes, 2012 .
7. *Conocimientos actuales en la fisiopatología de la sepsis.* **Ortiz J, Garnacho M.** s.l. : Medicina Intensiva, 2005, Vols. 29(3): 135-41.
8. *HIV infection and the gastrointestinal immune system.* **Brenchley JM, Douek DC.** Jan; 1(1): 23-30, s.l. : Mucosal Immunol., 2008.
9. *Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy.* **Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al.** Nov; 77 (21):11708-17, s.l. : J Virol, 2003.
10. *Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes.* **Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S.** Aug; 72(8):6646-56, s.l. : J Virol., 1998.
11. *Human intestinal lamina propria lymphocytes are naturally permissive to HIV-1 infection.* **Lapenta C, Boirivant M, Marini M, Santini SM, Logozzi M, Viora M, et al.** Apr, 29(4):1202-8, s.l. : Eur J Immunol., 1999.
12. *Altered CD4+ cell homing to the gut impairs mucosal immune reconstitution in treated HIV-infected individuals.* **Mavigner M, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi FE, Requena M, Pasquier C, et al.** Jan;122(1): 62-9, s.l. : J Clin Invest, 2012.
13. *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract.* **Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al.** Sep 20; 200(6):761-70, s.l. : J Exp Med., 2004.

14. *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infectio.* **Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al.** 12(12):1365-71, s.l. : Nat Med., 2006.
15. *Association of microbial translocation biomarkers with clinical outcome in controllers HIV-infected patients.* **Leon A, Leal L, Torres B, Lucero C, Inciarte A, Arnedo M, et al.** mAR 27;29(6):675-81, s.l. : AIDS, 2015.
16. *Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count.* **Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, Bellistri GM, Castagna A, Galli M, et al.** jUL 17;25(11):1385-94, s.l. : AIDS, 2011.
17. *Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome.* **Monaco CL, Gootenberg DB, Zhao G, Handley SA, Ghebremichael MS, Lim ES et al.** Mar 9;19(3):311-22, s.l. : Cell Host Microbe, 2016.
18. *Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-1 and HIV-2 infections.* **Nowroozalizadeh S, Mansson F, da Silva Z, Repits J, Dabo B, Pereira C, et al.** Apr 15;201 (8):1150-4, s.l. : J Infect Dis., 2010.
19. *Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection.* **Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al.** Mar 15;203(6):780-90, s.l. : J Infect Dis, 2011.
20. *Human immunodeficiency virus and the gastrointestinal immune system: does highly active antiretroviral therapy restore gut immunity?* **Costiniuk CT, Angel JB.** Nov;5(6):596-604, s.l. : Mucosal Immunol, 2012.
21. *Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection.* **Tincati C, Douek DC, Marchetti G.** 13:19, s.l. : AIDS research and therapy, 2016.
22. *Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy.* **Merlini E, Bai F, Bellistri GM, Tincati C, d'Arminio Monforte A, Marchetti G.** Apr 11;6(4): e18580, s.l. : PLoS One, 2011.
23. *Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS.* **Giulia Marchetti, a Camilla Tincati, a Guido Silvestri.** 2013, Clinical Microbiology Reviews.
24. *Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection.* **Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Bhalchandra S, Tai AK, Kane AV, Wanke CA, Ward HD.** 211(1): 19-27, s.l. : The Journal of infectious diseases, 2015.
25. *Low Levels of Microbial Translocation Marker LBP Are Associated with Sustained Viral Response after Anti-HCV Treatment in HIV-1/HCV Co-Infected Patients.* **Jessica Nystrom, Jenny Stenkvis, Amanda Haggblom, Ola Weiland and Piotr Nowak.** 10(3): e0118643, s.l. : PLoS One, 2015.
26. *Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection.* **Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, Kleiner DE, Deeks SG, Liang TJ, Heller T, Douek DC.** 141(4):1220-30, 1230.e1-3, s.l. : Gastroenterology, 2011.
27. *Microbial translocation and liver disease progression in women coinfecting with HIV and hepatitis C virus.* **Frech AL, Evans CT, Agniel DM, Cohen MH, Peters M, Landay AL, Desai SN.** Aug 15: 208(4):679-89. doi: 10.1093/infdis/jit225, s.l. : J Infect Dis, 2013.

28. *THE ROLE OF ENDOTOXIN IN THE EXTRACELLULAR COAGULATION OF LIMULUS BLOOD.* Levin J, Bang FB. 115:265-74, s.l. : Bulls Johns Hopkins Hosp, 1964.
29. *An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism.* Young N. S., J. Levin, R. A. Prendergast. 51:1790, s.l. : J. Clin. Invest, 1972.
30. *Unraveling the relationship between microbial translocation and systemic immune activation in HIV infection.* Liang Shan¹ and Robert F. Siliciano^{2, 3}. 2014, The journal of clinical investigation.
31. *The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. .* Matteo Vassallo, Patrick Mercié, Jacqueline Cottalorda. 2012, VIROLOGY JOURNAL.
32. *Chasing a ghost? – Issues with the determination of circulating levels of endotoxin in human blood.* Anne Gnauck, Roger Graham Lentle & Marlina Cathorina Kruger. 2016, Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.
33. *Immune Activation Is Associated With Increased Gut Microbial Translocation in Treatment-Naive, HIV-Infected Children in a Resource-Limited Setting.* Sudheesh Pilakka-Kanthikeel, PhD*, Arheart Krist†, Anbalagan Selvaraj‡, Soumya Swaminathan‡, and Savita Pahwa*. 2014, HHS Public Access.
34. *Increased Microbial Translocation in ≤180 Days Old Perinatally Human Immunodeficiency Virus Positive Infants as Compared with Human Immunodeficiency Virus -Exposed/Uninfected Infants of Similar Age.* EMMANOUIL PAPASAVVAS, PHD*,†, LIVIO AZZONI, MD, PHD*,†, ANDREA FOULKES, SCD‡,. 2011, NIH Public Access.
35. *Microbial Translocation and Metabolic and Body Composition Measures in Treated and Untreated HIV Infection.* Tamara Timmons, 1,2 Changyu Shen,3 Grace Aldrovandi,2,4 Adrienne Rollie,2,4 Samir K. Gupta,5. 2014, AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES.
36. *Contribution of Intestinal Barrier Damage, Microbial Translocation and HIV-1 Infection Status to an Inflammaging Signature.* Amanda K. Steele¹, Eric J. Lee¹, Brian Vestal³, Daniel Hecht¹, Zachary Dong¹, Eric Rapaport¹. 2014, PLOS ONE.
37. *Intestinal Microbiota, Microbial Translocation, and Systemic Inflammation in Chronic HIV Infection.* Duy M. Dinh, 1 Gretchen E. Volpe,1,2 Chad Duffalo,1 Seema Bhalchandra,1 Albert K. Tai,3 Anne V. Kane,1. 2014, Journal of Infectious Diseases Advance Access.
38. *Paper del sistema serotoninérgico en la fisiopatología intestinal.* Mesonero J, Latorre E, Mendoza C, Matheus N. 15:72-9, s.l. : Gaceta de Ciencias Veterinarias, 2012.
39. *How intestinal bacteria can promote HIV replication.* Shu Z, Ma J, Tuerhong D, Yang C, Upur H. Jan-Mar, 15 (1):32-7, s.l. : AIDS Rev, 2013.

