



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Cambios en intestino delgado en pacientes con VIH,
identificados con cápsula endoscópica”.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA TORRES RUIZ

TUTORA:

DRA. SANDRA MARIA PINTO CARDOSO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
INTRODUCCION	8
Anatomía del intestino delgado.....	8
La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).....	11
Abordaje clínico del intestino delgado.	19
Planteamiento del problema	25
Preguntas de investigación.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivo secundario.....	25
Justificación.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Descripción del método.....	30
Participantes del grupo VIH positivo con infección aguda	30
Participantes del grupo VIH negativo (grupo control)	33
Descripción de los procedimientos.....	34
Estudio de cápsula endoscópica	35
Toma de muestra de sangre.....	37
Recolección de heces	40
Cálculo de muestra y análisis estadístico	40
RESULTADOS.....	42
Descripción de la cohorte VIH positiva.....	42
Hallazgos por cápsula endoscópica.....	45
Marcadores séricos	52
Asociaciones entre marcadores séricos y hallazgos por CE.....	56
Descripción del único participante en el grupo control (VIH negativo)	61
DISCUSION	62
CONCLUSIONES.....	74
AGRADECIMIENTOS.....	75
BIBLIOGRAFÍA.	76

ANEXOS.....	80
ANEXO 1. Antirretrovirales disponibles en México	80
ANEXO 2. Revisión de seguridad para el uso de cápsula endoscópica en investigación	83
ANEXO 3. Oficios de aprobación del protocolo por el Comité de Ética e Investigación	88
ANEXO 4. Consentimiento Informado para participantes VIH positivos aprobado por el Comité de Ética e Investigación	91
ANEXO 5. Consentimiento Informado para participantes VIH negativo aprobado por el Comité de Ética e Investigación	103
ANEXO 6. Carta de autorización de Bioseguridad	115
ANEXO 7. Cuestionario para participantes.....	117
ANEXO 8. Instrucciones del fabricante para la determinación cuantitativa de I-FAB.....	118
ANEXO 9. Instrucciones del fabricante para la determinación cuantitativa de sCD14	134
ANEXO 10. Instrucciones del fabricante para la determinación cuantitativa de sCD163 ..	150
ANEXO 11. Instrucciones del fabricante para la determinación cuantitativa de PCR.....	163
ANEXO 12. Instrucciones del fabricante para la determinación cuantitativa de IL-6	179
ANEXO 13. Concentración de la curva estándar de sCD14.....	191
ANEXO 14. Concentración de la curva estándar de PCR	192
ANEXO 15. Concentración de la curva estándar de sCD163	193
ANEXO 16. Concentración de la curva estándar de I-FABP	194
ANEXO 17. Concentración de la curva estándar de IL-6.....	195

ABREVIATURAS

3TC Lamivudina

AINES Analgésicos no esteroideos

ARN Ácido ribonucleico

BIC Bictegravir

CE Cápsula endoscópica / Video cápsula endoscópica

CIENI Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas

CV Carga viral

DOR Doravirina

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FDA Food Drug Administration

FTC Emtricitabina

GALT Tejido Linfoide Asociado a Intestino

HSH Hombres que tienen sexo con hombres

ID Identificador

I-FABP Proteína de unión a ácidos grasos-intestinal

IL-6 Interleucina 6

IMC Índice de Masa Corporal

INER Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

INNTR Inhibidores no nucléosidos de la transcriptasa reversa

INTR Inhibidores nucléosidos de la transcriptasa reversa

IP Inhibidores de la proteasa

LPV/r Lopinavir potenciado con ritonavir

RAL Raltegravir

RCP Reacción en cadena de la polimerasa

RTV Ritonavir

sCD14 CD14 soluble

sCD163 CD163 soluble

SIDA Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TAF Tenofovir alafenamida

TDF Tenofovir

TAR Tratamiento antirretroviral altamente efectivo

VIH Virus de Inmunodeficiencia Humana

ZDV Zidovudina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tejido Linfoide Asociado a Mucosas del intestino delgado y sus principales componentes.....	11
Figura 2. Representación esquemática del VIH y sus componentes principales.....	12
Figura 3. Esquema de la evolución natural de la infección por VIH.....	13
Figura 4. Imágenes endoscópicas de íleon terminal en un paciente VIH negativo (A) y en otro paciente VIH + (B).....	14
Figura 5. Fotomicrofotografías de mucosa de yeyuno, teñida con Hematoxilina-Eosina (x100).....	19
Figura 6. Esquema del procedimiento de cápsula endoscópica.....	22
Figura 7. Esquema del diseño del estudio.....	29
Figura 8. Clasificación de Fiebig para definir los estadios de infección aguda y temprana en los pacientes con VIH.....	32
Figura 9. Imágenes del intestino delgado sin alteraciones, obtenidas por CE en cuatro pacientes VIH positivos antes de iniciar tratamiento antirretroviral.....	46
Figura 10. Imágenes del intestino delgado, obtenidas por CE en un paciente VIH positivo, antes de iniciar tratamiento antirretroviral.....	47
Figura 11. Imágenes del intestino delgado obtenidas por CE en un paciente VIH positivo con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable.....	47
Figura 12. Gráfico de barras apiladas de los segmentos intestinales sin hallazgos patológicos por CE, antes y después de recibir terapia antirretroviral.....	48
Figura 13. Imágenes de los hallazgos en intestino delgado, obtenidas por CE en tres pacientes VIH positivos con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable.....	49
Figura 14. Gráfico de barras de los hallazgos por CE en pacientes VIH positivos, vírgenes a tratamiento antirretroviral y con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable.....	50
Figura 15. Marcadores séricos por paciente, antes y después de terapia antirretroviral.....	55
Figura 16. Gráficos de dispersión entre los marcadores séricos y la cantidad de hallazgos endoscópicos.....	57
Figura 17. Gráfico de dispersión entre la cuenta de linfocitos T CD4+ y el número de hallazgos por CE.....	58
Figura 18. Gráfica de barras de cada participante con mediciones pareadas, que muestra la proporción del resultado de los marcadores séricos y de la cantidad de hallazgos por CE, correspondientes a antes y después del tratamiento antirretroviral.....	60
Figura 19. Imágenes de los hallazgos en intestino delgado, obtenidas por CE en un paciente VIH negativo.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Células del epitelio intestinal, su función específica y su localización.....	9
Tabla 2. Antirretrovirales y sus efectos gastrointestinales relevantes.....	17
Tabla 3. Definiciones de las variables reportadas por CE.....	37
Tabla 4. Edad, peso e IMC de los participantes VIH positivos.....	43
Tabla 5. Características clínicas de los participantes VIH positivos.....	44
Tabla 6. Linfocitos T CD4+, CD8+ y carga viral antes y después del tratamiento antirretroviral en los participantes VIH positivos.....	45
Tabla 7. Hallazgos totales y por segmento del intestino delgado antes y después del tratamiento antirretroviral.....	51
Tabla 8. Marcadores séricos de cada participante antes de iniciar tratamiento antirretroviral y después de alcanzar carga viral indetectable con tratamiento antirretroviral..	54

INTRODUCCION

Anatomía del intestino delgado.

El intestino delgado es una estructura tubular, que anatómicamente inicia en el píloro y termina en la válvula ileocecal. Su segmento más proximal es el duodeno, el cual se divide en 4 porciones (superior, descendente, horizontal y ascendente). Distal al ligamento de Treitz, el intestino delgado continúa con la segunda porción denominada yeyuno, la cual mide aproximadamente 2.5 m de longitud y tiene una transición no definida hacia el íleon, que es el último segmento y mide 3.5 m en promedio. La superficie luminal del yeyuno se caracteriza por pliegues circulares, que representan dobleces circulares de la mucosa y la submucosa que sirven para incrementar su superficie; estos pliegues, disminuyen en cantidad conforme el intestino es más distal, hasta estar ausentes en el íleon.¹

La pared del intestino delgado está histológicamente formada por cuatro capas: mucosa, submucosa, muscularis propia y adventicia o serosa.

En la superficie luminal, se encuentra la mucosa, a su vez, compuesta por tres capas: epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa.

Las células del epitelio están organizadas en un eje cripta-vellosidad y proliferan diferenciándose constantemente. Esta especialización está dirigida por células madres localizadas en la base de las criptas. Conforme la célula se especializa, migra verticalmente hacia la porción apical de la vellosidad y se puede diferenciar en 7 tipos: enterocitos, células enteroendócrinas, células de Paneth, células caliciformes, células caveoladas, células en copa (oligomucosas) y células M.²

Cada una de ellas, con funciones específicas como se puede observar en la siguiente tabla.

(Tabla 1)

Tabla 1 . Células del epitelio intestinal, su función específica y su localización.

Célula	Función	Estructura	Localización
Enterocitos	Absorción	Columnar o cilíndrica, alta, con más de 3000 microvellosidades en el borde apical; y unida una a la otra por uniones complejas	La más predominante en todo el epitelio
Células de Paneth	Secreción de lisozima, antibacteriana y probable reguladora de la flora intestinal	Piramidales, grandes, con gránulos eosinófilos en su extremo apical que contienen lisozima y otras glicoproteínas	En la base de las criptas de Lieberkuhn
Células enteroendócrinas	Regulación local de la actividad intestinal, secretando hormonas hacia los capilares (secretina, colecistoquinina, etc)	Gránulos cercanos a la base de la célula	Localizadas en la cripta, pero puede encontrarse en otros sitios del epitelio
Células caliciformes	Secretan mucinógeno, que hidratado sirve como citoprotector y lubrica el tracto gastrointestinal	Forma de copa con grandes gránulos apicales	En todo el intestino, pero en mayor número en el íleon
Células caveoladas	Participan en quimiorrecepción y defensa parasitaria	Tiene un haz de microfilamentos apicales (penacho), unidos a microvellosidades que protruyen en el lumen	Raras, forman solo el 0.4% del epitelio intestinal
Células en copa (oligomucosa)	El extremo apical es ancho y se estrecha hacia la base	No conocida	Limitada al íleon terminal
Células M	Presentadoras de antígenos. Endocitosis de bacterias y virus desde el lumen hacia las placas de Peyer	Múltiples vesículas apicales, sin borde en cepillo	Por encima de las placas de Peyer.

Tabla 1. Células del epitelio intestinal, su función específica y su localización. Modificada de Cormack, (2000) ³

El epitelio intestinal actúa como una interfase entre el medio externo y el medio interno y presenta una doble función; participa en la digestión y absorción de nutrientes, mediada por

transportadores y canales que se encuentran en las membranas apicales y basolaterales de las células absortivas; y previene la entrada de patógenos al cuerpo, proporcionando protección como barrera física contra agentes infecciosos e inmunogénicos. Cualquier situación patológica que altere estas funciones, puede desencadenar procesos con una amplia diversidad de síntomas. Por lo tanto, la función de la barrera del epitelio es crucial para mantener la homeostasis y prevenir el paso de antígenos alimentarios y bacterias lumbinales. Esta función se consigue gracias, en parte, a las uniones estrechas, complejos multiproteicos ubicados en la zona más apical de las uniones intercelulares.⁴

La lámina propia es una base de tejido conectivo que da soporte al epitelio. Los linfocitos, mastocitos y células dendríticas se encuentran dentro de ella, así como folículos linfoides agrupados que pueden ser visualizados macroscópicamente en el intestino delgado, principalmente en el íleon, y se conocen como placas de Peyer.

En el intestino delgado se alberga el área más extensa y compleja del sistema inmune humano. Está constituida por las placas de Peyer, la lámina propia, los linfocitos intraepiteliales, los ganglios mesentéricos y los folículos linfoides aislados; recibe el nombre de Tejido Linfoide Asociado a Intestino (GALT, por sus siglas en inglés)⁵.

Por su parte, las células epiteliales participan en la respuesta inmune produciendo moco; secretando a la luz intestinal factores inflamatorios y antibacterianos; y capturando antígenos por endocitosis desde el lumen para presentarlos a las células dendríticas que activan la inmunidad específica en los folículos linfoides.

Una representación esquemática del GALT se observa en la figura 1.

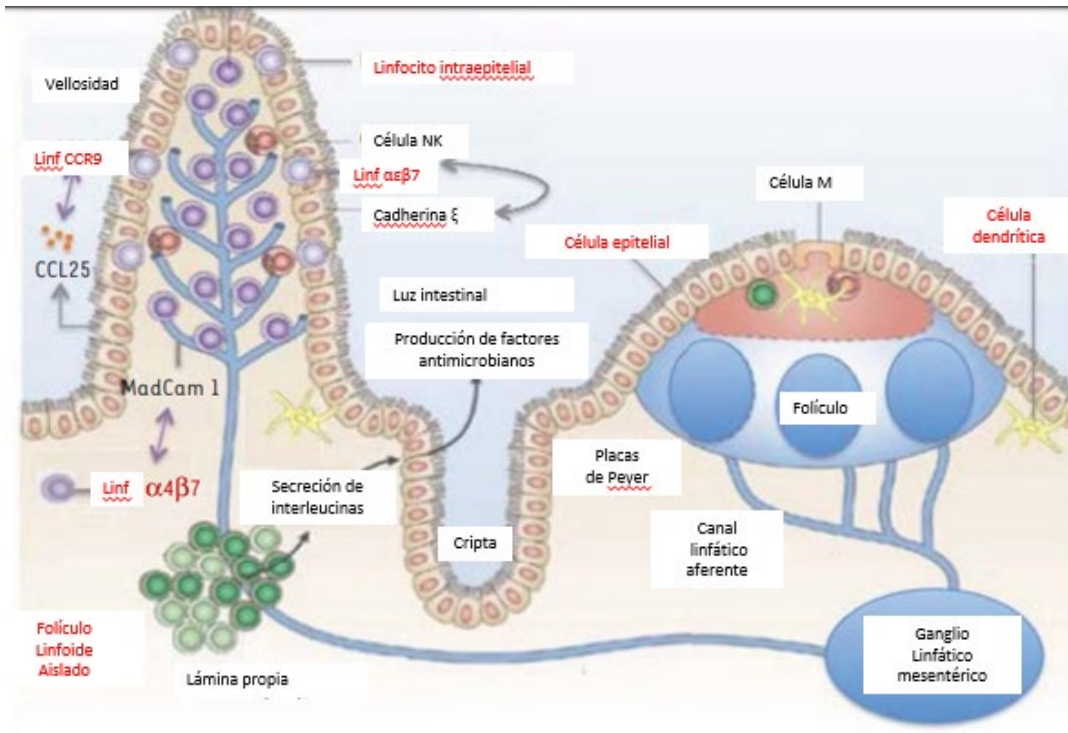


Figura 1. Tejido Linfoides Asociado a Mucosas del intestino delgado y sus principales componentes. Se observan los compartimentos anatómicos de la mucosa: el sitio inductor o nódulo linfoides y el sitio efector con linfocitos de lámina propia. Imagen tomada de Vergnon-Miszczycha, 2015, ⁵ modificada por Torres-Ruiz.

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

En los primeros años de la década de los ochenta, aparecieron los reportes iniciales de un nuevo síndrome humano que se expandía desde el continente africano hacia países desarrollados y el resto del mundo. Conocido como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en 1983 se identificó un nuevo retrovirus como posible causante de dicha enfermedad⁶, y en 1986 se le nombró como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)⁷.

Se trata de un virus formado por dos moléculas idénticas de ácido ribonucleico, que pertenece a la familiar retroviridae, y a la subfamilia lentivirus. Posee una estructura esférica, de aproximadamente 110nm de diámetro y tres capas. Una capa externa o envoltura formada por una membrana lipídica, donde se insertan las glucoproteínas gp120 y gp41; debajo de la

membrana lipídica se encuentra la proteína matriz p17. La segunda capa es una cápside icosaédrica formada por la proteína p24 y la última, una capa interna o nucleoide que contiene el ácido ribonucleico (ARN) viral, la nucleoproteína p7 y algunas enzimas (proteasa, integrasa, transcriptasa). Además de los tres genes estructurales de los retrovirus (env, gag y pol), hay una serie de genes reguladores (tat, rev, nef, vif, vpr, vpu, vpx y tev) que se encargan de la síntesis de las proteínas reguladoras para la replicación viral^{8, 9}. (Figura 2)

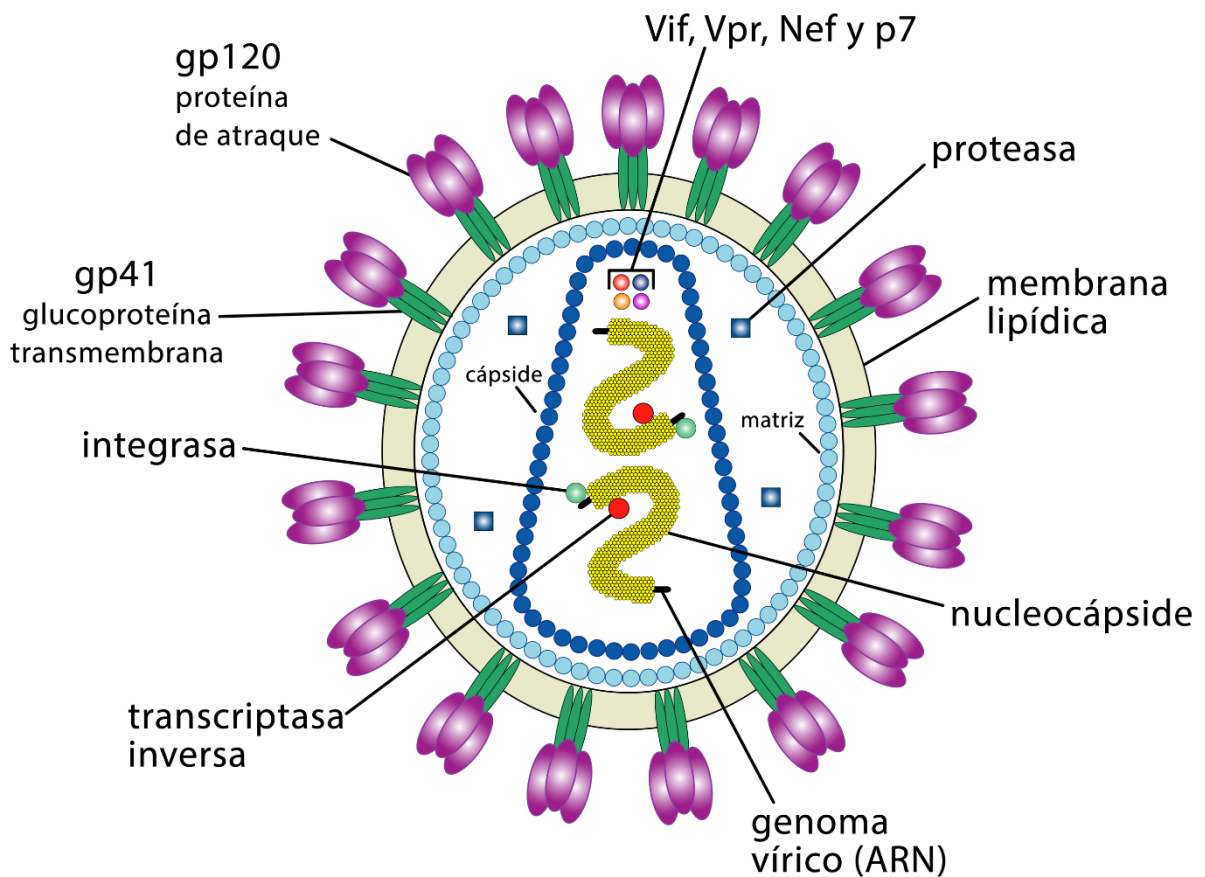


Figura 2. Representación esquemática del VIH y sus componentes principales. Tomado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3A800px-HIV_Viron_es.png#metadata, modificado de <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm>

La historia natural de la infección por VIH se caracteriza por 3 fases (aguda, crónica y SIDA) (Figura 3). Durante la fase aguda, los linfocitos T CD4+, células blanco del virus¹⁰ son

depletadas masivamente. Más del 60% de los linfocitos T CD4+ del cuerpo humano residen en el tracto gastrointestinal, particularmente los linfocitos T CD4+ activados o de memoria que expresan el co-receptor de entrada CCR5; por lo que, la mucosa intestinal es especialmente susceptible a la infección y replicación del virus¹¹.

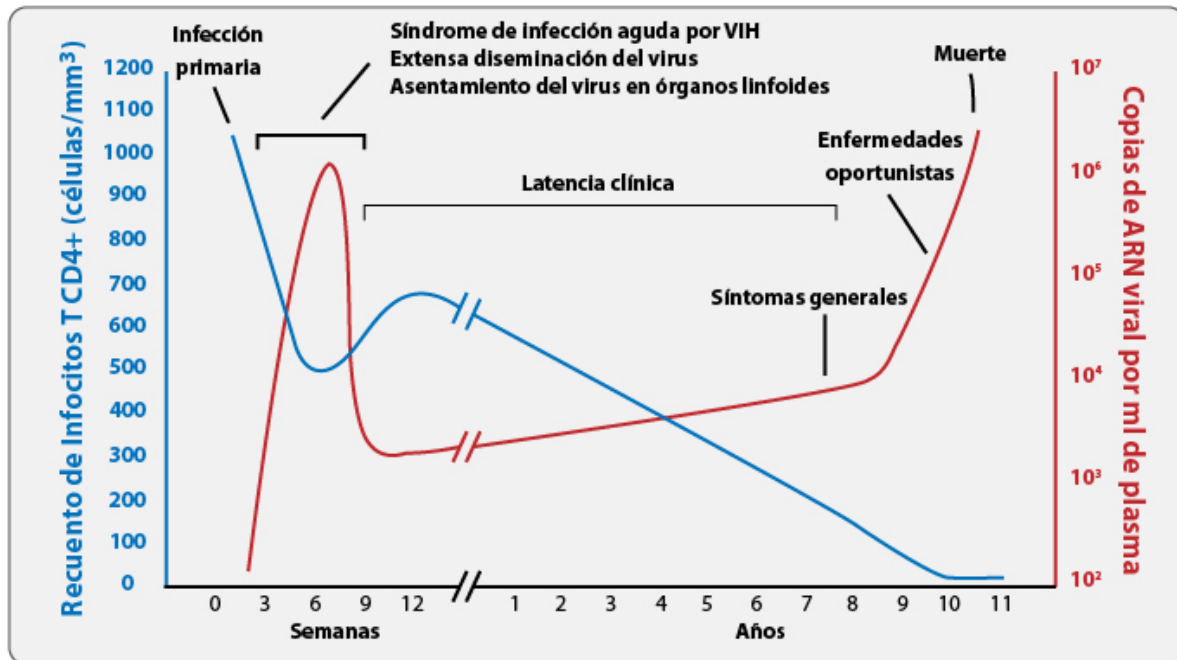


Figura 3. Esquema de la evolución natural de la infección por VIH. Se ejemplifica la disminución pronunciada de linfocitos T CD4+ en la sangre, durante la fase aguda. Tomado del Manual de Procedimientos Estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Secretaria de Salud, 2020.¹²

El primer estudio que demostró la importancia del GALT en la infección por VIH fue publicado por Brenchley y colaboradores¹⁰. Ellos compararon biopsias de íleon terminal (placas de Peyer), obtenidas por colonoscopia, de individuos con distintos estadios de la enfermedad, con la población de T CD4+ en ganglios linfáticos, en sangre y con controles VIH negativos.

La cantidad de T CD4+ específicamente en el íleon terminal fue significativamente menor en los pacientes infectados por VIH, aún en estadios muy tempranos de la enfermedad (fase

aguda). Incluso, los autores muestran los cambios en la apariencia anatómica del íleon terminal entre un paciente VIH positivo y uno negativo; siendo un patrón nodular o en empedrado muy marcado el que predomina en un individuo no VIH, en contraste con una mucosa lisa y plana de un paciente VIH positivo¹⁰, demostrando la ausencia de estructuras linfoides secundarias como placas de Peyer en estos pacientes. (Figura 4)

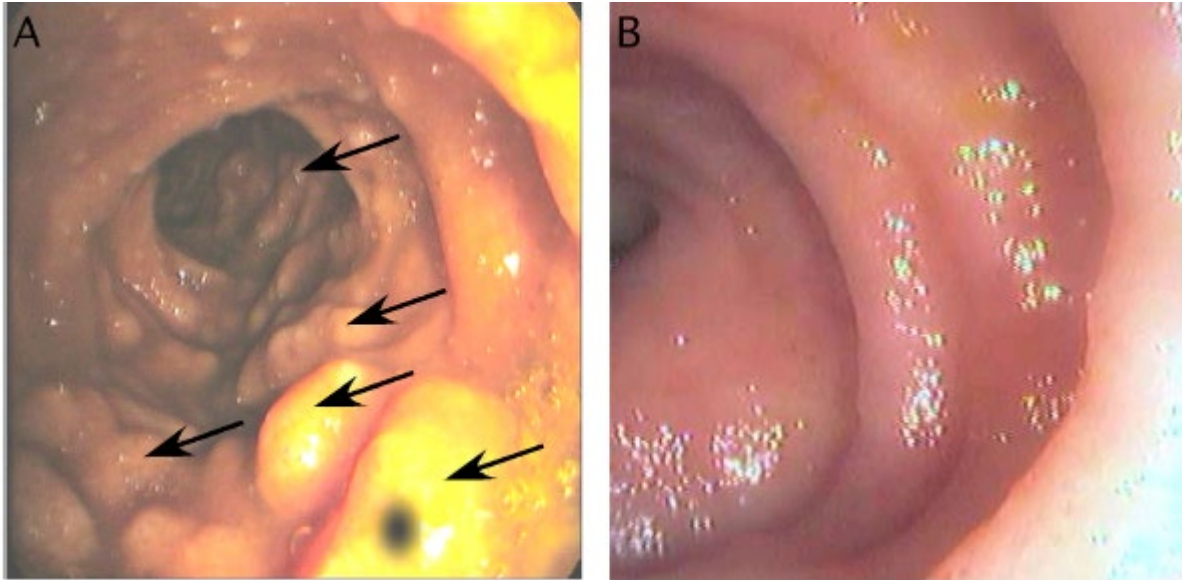


Figura 4. Imágenes endoscópicas de íleon terminal en un paciente VIH negativo (A) y en otro paciente VIH + (B). Las flechas señalan folículos linfoides, los cuales no se observan en el participante con infección por VIH. Tomado de Brechley et al, 2004.¹⁰

En un estudio realizado en biopsias de recto y sangre periférica, Mehandru y colaboradores¹¹, también demostraron que la depleción de las células T CD4+ de la mucosa intestinal es significativamente mayor comparado con la sangre periférica, en pacientes con infección aguda y reciente por VIH. Examinaron por separado los compartimentos anatómicos de la mucosa: el sitio inductor o nódulo linfoide y el sitio efector (linfocitos de lámina propia). El sitio inductor de los pacientes con infección temprana por VIH, estaba densamente poblado de T CD4+ (igual que en los controles no VIH), pero con una cantidad mayor de T CD8+, en contraste con los controles no VIH. Por el contrario, el sitio efector sí mostró una disminución

más importante de los T CD4+ en la infección temprana; y las células que expresan el virus (HIV-1 RNA) estuvieron localizadas predominantemente en los folículos linfoides organizados (sitio inductor) de la mucosa intestinal.

Con este trabajo, los autores confirmaron que la depleción de células T CD4+ en la mucosa gastrointestinal ocurre durante la infección aguda por VIH (replicación activa del virus), aún antes de que se note en la sangre periférica y sucede predominantemente en el compartimento efector de la mucosa gastrointestinal.¹¹

La disminución de los linfocitos T CD4+ en la mucosa gastrointestinal tiene como consecuencia, entre otras, la translocación de productos bacterianos. La inflamación producida por la infección y muerte masiva de los linfocitos T CD4+ intestinales provoca cambios en la arquitectura intestinal, al inducir la muerte de los enterocitos, lo que compromete la integridad del epitelio. Este fenómeno permite el paso de componentes bacterianos (e.g. lipopolisacáridos, flagelina) del lumen del intestino a la circulación sistémica. Los productos de las bacterias son reconocidos por el sistema inmunológico innato, mediante receptores que reconocen patrones asociados a patógenos, lo que provoca la producción de citocinas pro-inflamatorias, que contribuyen a la inflamación crónica y persistente que caracteriza a la infección por VIH y que induce el avance de la enfermedad^{13, 14}.

Los cambios que suceden en el intestino delgado por la infección, clínicamente pueden manifestarse en el paciente con diarrea e inflamación gastrointestinal, secundarias al aumento en la permeabilidad intestinal y la malabsorción de ácidos biliares. Estos síntomas se han agrupado en una entidad conocida como enteropatía por VIH¹⁵, que

histopatológicamente se caracteriza por infiltrados inflamatorios de linfocitos y daño al epitelio, que ocasiona aplanamiento, atrofia de vellosidades e hiperplasia de las criptas.

La implementación del Tratamiento Antirretroviral Altamente Efectivo (TAR), modificó drásticamente la evolución de la enfermedad. La incidencia de enfermedades asociadas a SIDA, sus complicaciones y la mortalidad disminuyeron.¹⁶

El TAR es la combinación de dos o tres fármacos, que, por medio de distintos mecanismos de inhibición de la replicación del virus, disminuyen la cantidad de copias del virus en la sangre hasta niveles indetectables, es decir menos de 40 copias/mL de plasma (límite de detección de las pruebas clínicas convencionales). Si bien el TAR no logra eliminar la replicación viral por completo, sí permite la reconstitución parcial de las funciones del sistema inmunológico y el aumento progresivo en el número de T CD4+ séricos en la mayoría de los pacientes. Además, al suprimir la tasa de replicación viral reduce de manera importante el riesgo de transmitir la infección (indetectable=intransmisible).

En México, los fármacos antirretrovirales son de acceso gratuito para toda la población. Existen más de 20 medicamentos disponibles, con distintos mecanismos de acción, en presentación única o co-formulados en una sola tableta (Anexo 1). Actualmente, en personas adultas con VIH, sin tratamiento previo, la Secretaría de Salud¹⁷ recomienda dos esquemas preferentes de co-formulados en una tableta: bictegravir/tenofovir alafenamida/emtricitabina (BIC/TAF/FTC) y dolutegravir/abacavir/lamivudina (DTG/ABC/3TC). BIC y DTG son inhibidores de la integrasa y están combinados con dos inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR) respectivamente.

El TAR mejora los síntomas gastrointestinales que presentan los pacientes con inmunosupresión avanzada; pero también se asocia con efectos adversos gastrointestinales, en mayor o menor medida, dependiendo de su mecanismo de acción.

La Guía de manejo antirretroviral de las personas con VIH de la Secretaría de Salud¹⁷, en el apartado de “efectos colaterales/tóxicos relevantes de los fármacos antirretrovirales”, menciona la náusea y el vómito en los INTR, e intolerancia gastrointestinal específicamente en 3TC, FTC, zidovudina (ZDV) y tenofovir (TDF). En el grupo de los inhibidores de la proteasa (IP), también considera la intolerancia gastrointestinal, con énfasis en lopinavir potenciado con ritonavir (LPV/r) y ritonavir (RTV) que se asocian a náusea, vómito y diarrea. Por último, en los inhibidores de la integrasa, BIC y raltegravir (RAL), se describen náusea y vómito como efectos colaterales (Tabla 2).

Tabla 2. Antirretrovirales y sus efectos gastrointestinales* relevantes	
Antirretroviral	Efecto gastrointestinal
INTR 3TC, ZDV, FTC, TDX TAF	Náusea y vómito Intolerancia GI Diarrea y náusea
INNTR DOR	Náusea
IP LPV/r, RTV	Intolerancia gastrointestinal Náusea, vómito, diarrea
Inhibidores de integrasa BIC, RAL	Diarrea, náusea

Tabla 2. Antirretrovirales y sus efectos gastrointestinales relevantes. *No se incluyen efectos hepáticos y pancreáticos. INTR: Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa, 3TC: lamivudina, ZDV: zidovudina, FTC: emtricitabina, TDF: tenofovir, TAF: tenofovir alafenamida, INNTR: Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa, DOR: Doravirina, IP: Inhibidores de la proteasa, LPV/r: lopinavir potenciado con ritonavir, RTV: ritonavir, BIC: bicitegravir, RAL: raltegravir. Modificada de la Guía para el manejo de antirretrovirales de la Secretaría de Salud, 2021¹⁷.

La mayoría de los efectos adversos gastrointestinales se asocian con regímenes que incluyen INTR o IP^{18, 19}. Algunos estudios han mostrado incremento importante de la apoptosis de las células epiteliales del intestino secundario al uso de IP, lo cual modifica el tamaño de las

vellosidades, la función de la barrera epitelial y el transporte de agua y electrolitos causando diarrea²⁰. El RTV como potenciador de otros IP ha mostrado un rango amplio de efectos adversos gastrointestinales, los cuales varían dependiendo de la dosis de RTV utilizada y del IP que lo acompaña. La combinación que se asocia con mayor tasa de diarrea es LPV/r y fosamprenavir/ritonavir²¹.

El efecto del TAR en los cambios ocasionados por el virus en el intestino delgado aún es controversial. La mayoría de los estudios se han realizado en biopsia de colon (intestino grueso), pero en biopsias de íleon terminal, en individuos con VIH y varios años con TAR efectivo se ha demostrado una recuperación incompleta de los linfocitos T CD4+ y más copias del virus en el GALT en comparación con células mononucleares de sangre periférica^{10, 22}. Aunque el TAR permite la reconstitución parcial de las funciones del sistema inmunológico y el aumento progresivo en el número de T CD4+ séricos, en la mayoría de los pacientes, raramente reconstituye la población de células en el intestino delgado²³.

En un estudio que comparó el tamaño de las criptas epiteliales del yeyuno en biopsias de sujetos VIH positivos con TAR, contra controles no VIH, y pacientes VIH coinfectados con *Microsporidium*, sin TAR, Batman y colaboradores²⁴, midieron la longitud de 56 criptas contando el número de enterocitos de un lado de la cripta, desde la base hasta su unión con una vellosidad. La diferencia de la longitud de la cripta, entre el grupo control y el grupo de VIH sin TAR fue significativa; pero no hubo diferencia entre el grupo control y los pacientes VIH tratados. Es decir, que la co-infección de *Microsporidium* y VIH induce la hipertrofia de las criptas, mientras que el TAR reduce la longitud de la cripta a su tamaño normal. Los autores sugieren que la hiperplasia de las criptas en la enteropatía por VIH se debe a la estimulación

de las células madres por el virus *per se*, y que la restauración de la estructura de la mucosa intestinal por el TAR se debe a la inhibición de la hiperproliferación de las células madre.

En la siguiente imagen, se muestran las fotomicroscopías del epitelio intestinal, tomadas del artículo mencionado²⁴. (Figura 5)

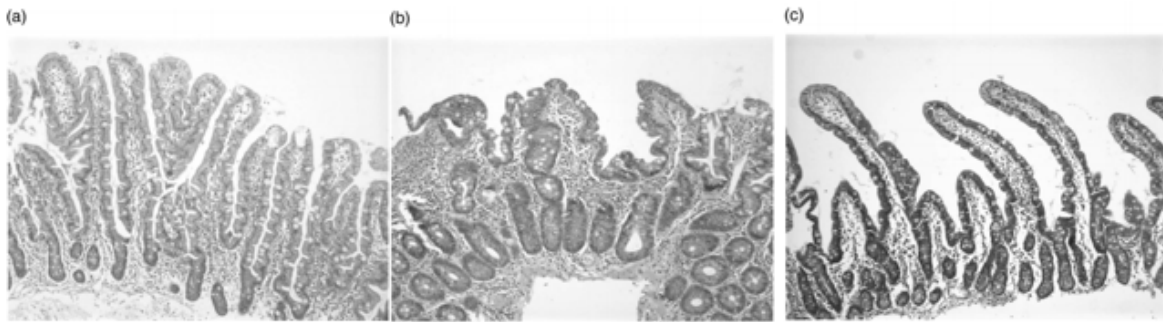


Figura 5. Fotomicrofotografías de mucosa de yeyuno, teñida con Hematoxilina-Eosina (x100). La imagen (a) corresponde a mucosa de un sujeto control; la (b) de un sujeto con VIH y microsporidias, que muestra hipertrofia de las criptas y acortamiento de las vellosidades; y la (c) de una persona tratada con TAR, en la que la mucosa muestra un regreso a la morfología normal de las vellosidades. Tomado de Batman, (2014).²⁴

Abordaje clínico del intestino delgado.

La investigación del intestino delgado en humanos, en la infección por VIH, se ha visto limitada por la inaccesibilidad y la necesidad de procedimientos invasivos para su estudio.

Para el abordaje clínico del tubo digestivo humano se utilizan, entre otros, los estudios endoscópicos, que consisten en introducir un tubo delgado, con luz propia y una cámara en el extremo distal, a través de la boca o el ano. (Del griego *endo*, dentro de; *scopia*, ver u observar)²⁵.

La panendoscopia alta, consiste en introducir un endoscopio por la cavidad oral y avanzar a través del esófago y estómago, hasta el inicio del intestino delgado, convencionalmente hasta la segunda porción del duodeno.

Para explorar el intestino grueso, se puede realizar una colonoscopia, que es la introducción del endoscopio por el ano, y avanzar a través del recto, del colon derecho, del colon transverso y del colon izquierdo hasta el ciego. Con este procedimiento, el especialista puede canular la válvula ileocecal y observar la porción más distal del íleon terminal del intestino delgado, (generalmente 10 o 20cm).

El estudio del segmento de intestino delgado comprendido entre la segunda porción del duodeno y el íleon terminal, es difícil, tanto por la longitud del intestino, como por su anatomía y la consecuente falta de herramientas o instrumentos adecuados. Actualmente, tenemos dos opciones: la enteroscopia profunda (con sus diferentes técnicas: enteroscopia de un balón, enteroscopia en espiral y enteroscopia de doble balón), y la cápsula endoscópica (CE)²⁶.

La enteroscopia con doble balón es la técnica más ocupada y establecida de la enteroscopia. Consiste en la introducción por la boca o el recto en dirección al intestino delgado de un instrumento formado por dos tubos (uno dentro del otro). El tubo interior, que es un endoscopio, se avanza a través de un segmento del intestino delgado; un globo en el extremo de ese tubo se infla para mantener el endoscopio en su lugar. A continuación, el tubo exterior se mueve a través del intestino delgado para llegar al final del endoscopio y se infla un globo en el extremo del tubo exterior para mantenerlo en su lugar. Entonces, el globo en el extremo del endoscopio se desinfla y se avanza el endoscopio a través del siguiente segmento del intestino delgado. Estos pasos se repiten muchas veces a medida que los tubos se mueven a través del intestino delgado²⁷.

Dada la dificultad técnica del estudio, su tasa diagnóstica es de 68.1%, el tiempo de duración del estudio de 60 a 120 minutos, y su tasa de eventos adversos mayores y menores

(perforación, sangrado, pancreatitis, neumonía por aspiración) de hasta de 9.1% y 0.72% respectivamente²⁸. La enteroscopia no es un estudio que se realice de primera instancia, y su uso está reservado a situaciones muy específicas como toma de biopsias, hemostasia o la realización de alguna otra terapia endoscópica.

La CE permite visualizar la mucosa y el lumen del tracto gastrointestinal tras la ingesta de un dispositivo desechable (cápsula) y la transmisión de imágenes inalámbricas hacia un procesador de datos. El primer modelo de CE para el intestino delgado fue aprobado por la Food Drug Administration (FDA) en el 2001, y desde entonces, la tecnología ha mejorado su resolución, el tiempo de vida de la batería y su capacidad para observar diferentes áreas del tracto digestivo²⁹. Este sistema está integrado por tres partes: la cápsula desechable endoscópica; un cinturón con el grabador de datos y una batería; y una computadora personal con el software para la revisión e interpretación de las imágenes. Se representa esquemáticamente en la Figura 6.

La tecnología de la CE permite obtener hasta 32 imágenes por segundo de la mucosa del tubo digestivo, sin necesidad de sedar al paciente y con un riesgo de complicaciones muy bajo; por lo que, si se tiene disponible, es una muy buena alternativa para realizar investigaciones del intestino delgado.

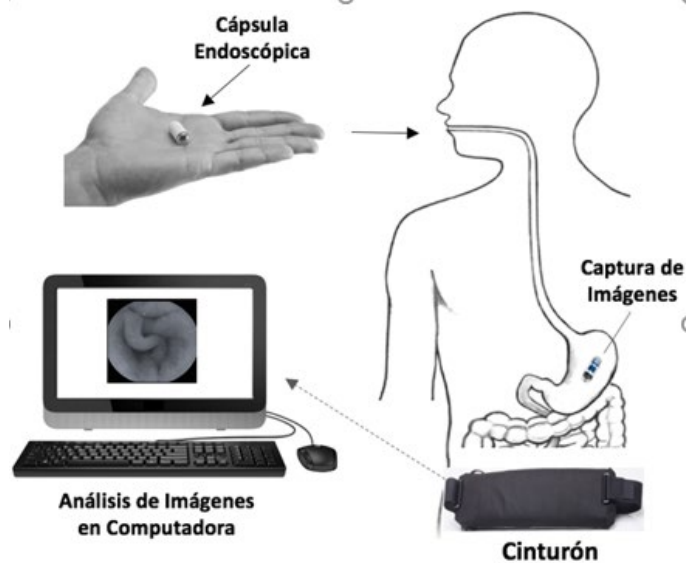


Figura 6. Esquema del procedimiento de cápsula endoscópica. Imágenes tomadas de www.medtronic.com, timmpplc.weebly.com y modificadas por Salgado-Montes de Oca.

Es un estudio relativamente simple y no invasivo para el paciente, quien sólo debe de tragar la cápsula, con un ayuno previo de 6 a 8 horas. Aproximadamente, en el 75% de los casos se logra visualizar el intestino delgado completo con 8 horas de batería, y generalmente se le pide al paciente que vigile la salida de la cápsula en sus evacuaciones.

Varias enfermedades o sospecha de enfermedades ameritan el uso de la cápsula endoscópica para su diagnóstico, como son: sangrado gastrointestinal oscuro (oculto o evidente), anemia por deficiencia de hierro; enfermedad de Crohn, vigilancia de pacientes con síndromes polipósicos, tumores del intestino delgado, síndromes malabsortivos (como enfermedad celiaca), diarrea crónica, enteropatía por analgésicos no esteroideos (AINES) e hipertensiva portal y dolor crónico abdominal en estudio³⁰. En estas enfermedades el uso de la cápsula tiene aplicaciones clínicas importantes porque evita el uso de métodos diagnósticos invasivos innecesarios, que ameritan anestesia, como la enteroscopia, la colonoscopia o incluso cirugía.

En general, un estudio con CE es un procedimiento seguro. Su efecto adverso potencial más importante es la retención de la cápsula, es decir, que no se excrete en la materia fecal. Una

“cápsula endoscópica retenida” se define como “aquella que permanece en el tracto digestivo un mínimo de dos semanas o aquella que ha requerido de terapia dirigida para lograr su tránsito”. La retención puede ocurrir cuando hay estenosis de cualquier etiología (como AINES, enfermedad de Crohn, tumores del intestino delgado, enteritis por radiación, y estenosis anastomóticas quirúrgicas). De manera ocasional, también se han reportado retenciones en otros sitios como divertículos de Zenker, divertículos duodenales, hernia umbilical, divertículos de Meckel.²⁹ La tasa de retención de la CE se estima entre 1.3 y 1.4%.³¹

Las lesiones que pueden observarse durante un estudio con CE y que dependiendo de la indicación y del cuadro clínico del paciente se consideran significativas, son: eritema, puntos rojos, erosiones, úlceras, pólipos, tumores, malformaciones vasculares de la mucosa (angiectasias), hiperplasia linfoide y marcadores endoscópicos de atrofia de vellosidades. Las definiciones de cada uno de estos términos se presentan en la parte correspondiente a la metodología de este trabajo.

En el 2009, investigadores alemanes, estudiaron en 49 pacientes la utilidad de la CE en pacientes con VIH; en el grupo de pacientes seropositivos con < 200 T CD4+ y síntomas gastrointestinales, encontraron 30 hallazgos patológicos; en otro grupo de pacientes con las mismas características pero sin síntomas gastrointestinales, reportaron 22 hallazgos patológicos y en el grupo control de voluntarios sanos, 13. Con este trabajo, demostraron la viabilidad del procedimiento en pacientes con VIH, y los hallazgos más comunes que reportaron fueron: atrofia de vellosidades, úlceras o aftas, hiperplasia linfoide, vellosidades linfangiectáticas y angiodisplasias.³⁰

En el 2017, en Japón, Sakai y colaboradores, realizaron el estudio de CE a 27 pacientes con VIH, el 67% con TAR y carga viral indetectable y seis al momento del diagnóstico. Los hallazgos no infecciosos más comunes fueron: erosiones, rojeces, úlceras y atrofia de vellosidades. En sus resultados, la asociación entre los factores clínicos y la atrofia de vellosidades no fue significativa. Los autores sugieren que la presencia de cambios en el intestino delgado no difiere entre los pacientes con TAR y sin TAR, siendo necesario un patógeno externo para causar daño; sin embargo, la atrofia de vellosidades se asoció a la infección con VIH aún con TAR³².

Planteamiento del problema

La investigación del impacto de la infección por VIH sobre la mucosa del intestino delgado del humano se ha visto limitado, porque es un sitio anatómico que necesita de métodos invasivos, como la enteroscopia, para su visualización y adquisición de tejido (biopsias). Así mismo, realizar estudios longitudinales es problemático, por la necesidad de varias adquisiciones y visualizaciones, que implican varios procedimientos invasivos. Aunque otros estudios han descrito los cambios en las poblaciones celulares de la lámina propia del intestino delgado en los modelos primates no humanos y en el humano, mediante el uso de biopsias, no existen estudios que describan los cambios anatómicos que suceden en la mucosa de todo el intestino delgado durante la fase aguda de la infección por VIH, y mucho menos, estudios que describan el efecto de la terapia antiretroviral sobre la mucosa del intestino delgado.

Preguntas de investigación

Las preguntas de investigación de este trabajo se dividen en primaria y secundarias. La primaria es, ¿cuáles son los cambios anatómicos en la mucosa del intestino delgado atribuibles al VIH, observados por CE en pacientes con infección aguda? Las secundarias, ¿cuáles de esos cambios revierten con el uso del TAR?, ¿el TAR causará daños adicionales a la mucosa intestinal, observables por CE?

Objetivo general

Identificar y describir por CE, los cambios causados por la replicación del VIH en la mucosa del intestino delgado, y el efecto del TAR a corto plazo (menos de 6 meses).

Objetivo secundario

Correlacionar los hallazgos por CE con marcadores de inflamación (interleucina 6 y proteína C reactiva), de daño epitelial (proteína de unión a ácidos grasos-intestinal), de activación de monocitos/macrófagos (CD163 soluble), y asociados indirectamente con translocación bacteriana (CD14 soluble).

Justificación

En el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) se cuenta con el estudio de CE y con los recursos humanos capacitados para realizarlo. La CE permite visualizar el intestino delgado completo, de forma segura, y con molestias mínimas para los participantes, por lo que se considera que su uso es apropiado con fines de investigación. (Anexo 2)

Hasta el momento, no hay estudios que hayan evaluado por CE los cambios anatómicos en la mucosa del intestino delgado en un mismo grupo de pacientes con VIH, antes y después del inicio del TAR.

Como la CE no permite la toma de biopsias del tejido intestinal, se tomó una muestra de sangre periférica, para medir marcadores que de forma indirecta reflejaran lo observado endoscópicamente en el epitelio del intestino. Esta intervención se consideró de bajo riesgo para los participantes.

Gracias a los convenios interinstitucionales y al desarrollo simultáneo de otras investigaciones con sujetos con diagnóstico reciente de infección por VIH en el CIENI del INER, la referencia de posibles participantes, fue constante hasta marzo del 2020.

Si bien, la realización de esta investigación no generó una ganancia directa para los participantes, su inclusión en el protocolo los benefició indirectamente con el acceso gratuito a algunos estudios; con la posibilidad de tener un diagnóstico oportuno de alguna patología encontrada incidentalmente durante la realización de la cápsula endoscópica o estudios de sangre y heces (cultivo), y con la posibilidad de tener mejor adherencia a sus medicamentos al saberse parte de una investigación longitudinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación más amplio, titulado “Cohorte de investigación longitudinal para el estudio del VIH/SIDA en México” aprobado por el Comité de Ética e Investigación del INER, con la clave C 71-18.

Para este fin académico se diseñó un estudio de cohorte, comparativo, prospectivo, transversal y longitudinal con dos grupos de estudio; uno con pacientes VIH positivos (VIH+) con infección reciente y otro con participantes VIH negativos (grupo control, sin VIH). (Figura 7).

A los participantes del primer grupo (VIH+), se les realizó toma de sangre, recolección de muestra de heces y estudio de CE antes de iniciar el TAR y una vez que la carga viral de VIH era indetectable.

A los participantes del grupo dos (VIH-), se les realizaron los tres estudios en una sola ocasión (transversal). Por tratarse del grupo control (sin VIH), se propuso pareamiento por edad y preferencia sexual con los participantes del grupo 1.

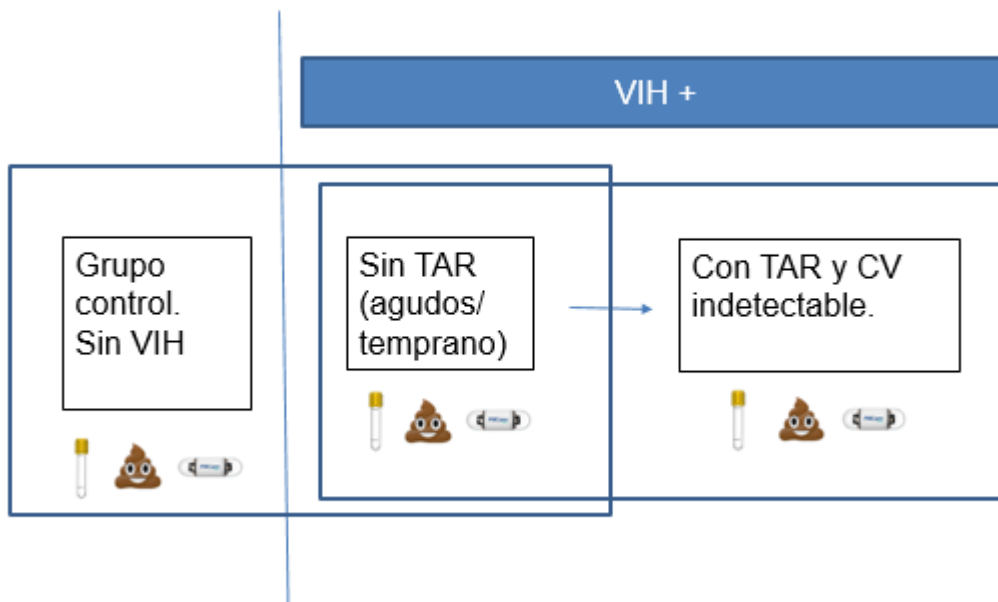


Figura 7. Esquema del diseño del estudio. Se reclutaron dos grupos, uno control (sin VIH) y otro de pacientes con diagnóstico reciente de VIH, en etapa temprana. A cada individuo se le realizó toma de muestra (sangre y heces) y estudio de CE. Se repitieron la toma de muestras y el estudio de CE cuando los individuos VIH+ alcanzaron una carga viral indetectable (<40 copias VIH-1/mL).

Los criterios de inclusión que se establecieron para ambos grupos fueron los siguientes:

Mayores de 18 años

Hombres que tienen sexo con hombres (HSH)

Sin consumo de AINES en los últimos 30 días.

Sin ingesta de antibióticos en los últimos 30 días.

Índice de masa corporal (IMC) menor a 30 kg/m²

Grupo VIH+: individuos con diagnóstico de VIH agudo, por ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y clasificación de Fiebig.

Grupo control/VIH-: individuos con prueba de ELISA negativa reciente.

Los criterios de exclusión fueron:

Antecedente de oclusión intestinal.

Antecedente de resección intestinal.

Diagnóstico conocido de diabetes mellitus

Uso de marcapasos

Incapacidad o dificultad para la deglución

Diagnóstico de enfermedades infecciosas gastrointestinales.

Y los de eliminación:

Estudio de CE incompleto

Coprocultivo o coproparasitoscópico positivo para algún agente patógeno

Hallazgos sugerentes de enfermedad gastrointestinal por CE

Descripción del método

Participantes del grupo VIH positivo con infección aguda

Los pacientes con infección por VIH, fueron referidos al CIENI desde la Clínica Condesa, con una prueba de ELISA positiva para VIH. En el laboratorio de diagnóstico virológico del CIENI, se repitió la prueba diagnóstica de ELISA de cuarta generación (Bio Rad®, Francia) y se confirmó el resultado con técnica de Western blot. La cuantificación de la carga viral se realizó con la técnica de RCP.

La infección por VIH, se divide en varios estadios clínicos durante las primeras semanas posteriores al contagio, los cuáles están definidos por la positividad escalonada de antígenos y anticuerpos específicos para VIH-1 en distintas pruebas diagnósticas; y fueron los que se utilizaron para clasificar a los participantes en una fase temprana de la infección. Se definen a continuación, de acuerdo con Fiebig³³, Mc Michael y colaboradores³⁴:

El tiempo entre la infección y la primera detección de ARN viral en el plasma por RCP, es referido como la fase de eclipse. Posterior a ésta, los pacientes se clasifican en los estadios del I al IV de Fiebig, los cuales se basan en la positividad secuenciada de los antígenos virales p24 y p31 medidos por ELISA y de anticuerpos específicos para VIH-1 detectados por Western blot. En el estadio I, se incluye a los pacientes con detección de RNA viral en el plasma por RCP; en el estadio II, a aquellos en los que, además, se identifica la proteína p24 por ELISA; y en el III, en los que están presentes anticuerpos específicos para VIH-1 identificados por la misma técnica. La detección de anticuerpos específicos para VIH por Western blot, clasifica a los pacientes en los dos estadios subsecuentes de Fiebig. Los pacientes progresan de una infección aguda a un estadio crónico temprano, al final del estadio V de Fiebig, aproximadamente 100 días después del inicio de la infección; y la presencia de la proteína p31 identificada por ELISA, marca el inicio del estadio VI o fase de infección temprana.^{33,34} (Figura 8).

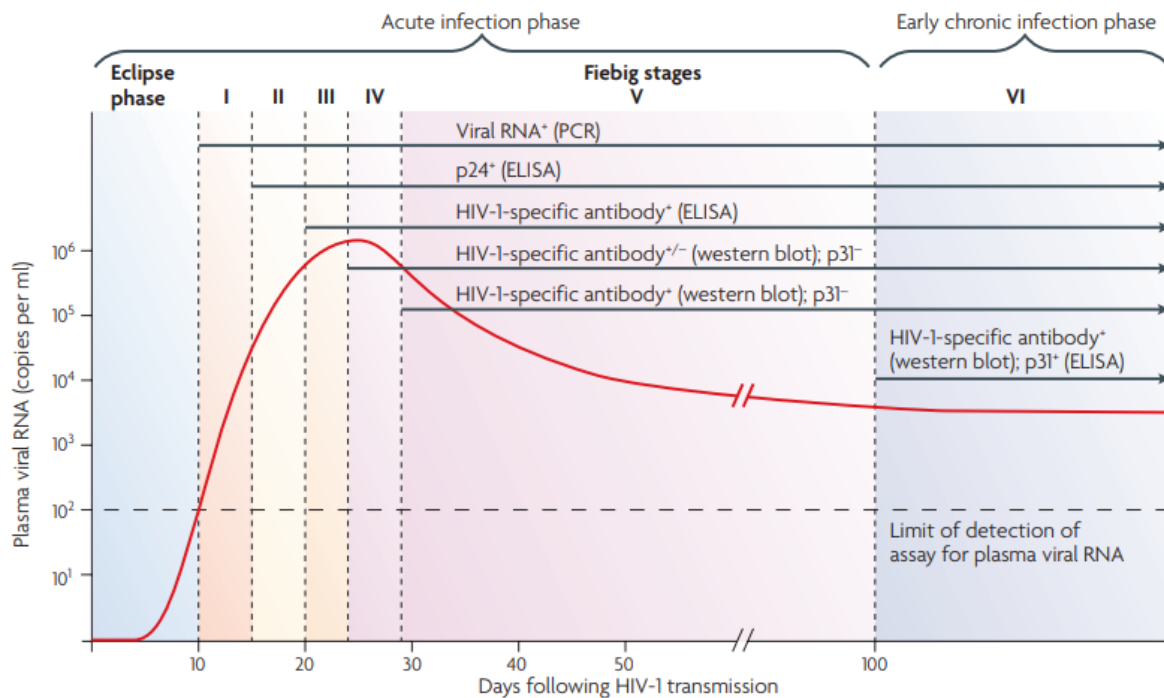


Figura 8. Clasificación de Fiebig para definir los estadios de infección aguda y temprana en los pacientes con VIH. Tomado de Mc Michael y colaboradores, 2010.³⁴

Una vez confirmado el diagnóstico, todos los pacientes recibieron consulta de consejería por parte del equipo de apoyo psicosocial del CIENI. Dado el interés de este estudio por identificar a los pacientes en una etapa aguda de la infección, la invitación a participar se realizaba a las pocas horas o días de conocer su diagnóstico, por lo que su situación emocional podía ser lábil. En esta consulta se identificaron alteraciones en el estado emocional del paciente, o situaciones que no le permitían decidir su participación voluntaria en la investigación. En caso de considerarse apto, se le informaba sobre las actividades científicas que se realizan en el CIENI y la trascendencia de las mismas.

A los individuos que cumplieran los criterios de inclusión y de exclusión, y que aceptaban participar en la investigación se les realizaban dos entrevistas.

En la primera, se proporcionó una explicación amplia de la investigación, incluyendo sus objetivos, los procedimientos a realizar y el riesgo beneficio de los mismos. Se les entregó el documento de consentimiento informado, y se resolvieron las dudas que pudieran tener.

La segunda reunión se agendaba máximo 48 horas después, dependiendo de la disponibilidad de tiempo del participante. En ésta, se recolectaban los consentimientos informados firmados, y se procedía a la toma de muestra sanguínea, a la recolección de la muestra de heces y a la realización del estudio de CE. El mismo día, el paciente acudía a consulta con su médico tratante para iniciar TAR.

Como parte del protocolo se ofrecía a los pacientes consultas de seguimiento clínico, que se agendaban en las fechas que el médico lo consideraba oportuno, por lo general, una al mes. De esta manera, se garantizaba que el paciente iniciara tratamiento de manera oportuna; que, en caso de presentar alguna reacción adversa, recibiera atención médica y que en cuanto se identificara con carga viral indetectable pudiera ser invitado a repetirse los estudios para la investigación (toma de sangre, de heces y CE).

En resumen, en este grupo, se realizó la CE, acompañada de muestra de sangre y de heces, en dos momentos distintos: antes de iniciar TAR, y cuando la carga viral fue indetectable.

Participantes del grupo VIH negativo (grupo control)

En el grupo control se planeó incluir individuos HSH, entre 20 y 35 años de edad, con una prueba de ELISA negativa para VIH, de menos de 5 días de realizada, e IMC a 30 kg/m²; idealmente pareados con el grupo VIH positivo.

Los candidatos podían ser referidos al CIENI desde la Clínica Condesa, o acudir por decisión propia para detección oportuna de la infección.

El procedimiento metodológico a seguir se diseñó de manera similar a lo que se brindó a los participantes del grupo uno. Al llegar al centro de investigación recibirían consulta de consejería, con la finalidad de identificar comportamientos de alto riesgo y brindarles información sobre protección y prácticas seguras para disminuir la posibilidad de contagio en el futuro; además, se les informaría sobre las investigaciones que se desarrollan en el CIENI, su trascendencia y la importancia de su participación.

Después de la valoración por el equipo de consejería, se les invitaría a participar en el protocolo siempre y cuando cumplieran los criterios de inclusión y no presentaran alguno de exclusión.

Al único participante del grupo control se le realizaron dos entrevistas. En la primera se le proporcionó una explicación amplia y detallada del protocolo, sus objetivos y los procedimientos a realizar. Se le entregaron los consentimientos informados, se le expuso el riesgo beneficio de las intervenciones y se resolvieron dudas relacionadas con esta investigación.

La segunda reunión se agendó antes 48 horas. En ésta se recolectaron los consentimientos informados, se tomó la muestra sanguínea, se recolectaron las heces y se realizó el estudio de CE.

Descripción de los procedimientos

Los procedimientos realizados en esta investigación fueron tres: estudio de CE, toma de muestra de sangre y recolección de heces. Se describen a continuación.

Estudio de cápsula endoscópica

La CE utilizada en todos los pacientes fue marca PillCam, modelo Colon2, del fabricante Medtronic; está hecha de plástico biocompatible, mide 32.3x 11.6mm y pesa 2.9gr; tiene dos cámaras, con 4 diodos en cada una, que emiten luz blanca y permiten un campo de visión de 170°. Detecta objetos de hasta 0.1mm de tamaño a una distancia de 3cm y la tasa de imágenes por segundo que graba es de 4 a 35fps.

El proceso para realizar el estudio fue el siguiente:

Un día previo se les pidió a los participantes que cenaran líquidos y que permanecieran en ayuno a partir de la medianoche. Al día siguiente, a las ocho de la mañana se les colocó el cinturón y el grabador de datos. Con medio vaso de agua deglutían la cápsula y se procedía a verificar en el visor para imágenes en tiempo real, su ubicación en la cámara gástrica.

Los pacientes recibieron la indicación de tomar líquidos claros tres horas más tarde, y su dieta habitual dos horas después.

El estudio se realizó de manera ambulatoria, por lo que los sujetos continuaban con sus actividades cotidianas el resto del día y regresaban ocho horas después al instituto para el retiro del cinturón y el grabador. En este momento se les reiteraba que la cápsula sería desechada en la materia fecal y que no era necesaria su recolección ni monitorización.

Para conocer si existía de algún síntoma gastrointestinal en las siguientes 24 a 72 horas, se llevó a cabo seguimiento telefónico.

Para la lectura de la CE se utilizó el Software RapidNet Versión 8. Ésta fue realizada por dos endoscopistas certificados, y en caso de existir alguna discrepancia entre ellos, revisaban nuevamente el segmento hasta obtener un consenso.

Las variables que se consideraron como hallazgos en la lectura de la CE fueron: edema, eritema, punto rojo, erosión, úlcera, marcadores de atrofia e hiperplasia linfoide. De cada una, en caso de estar presente, se indicó el segmento anatómico del intestino delgado en el que se observaba (duodeno, yeyuno o íleon).

A excepción de la hiperplasia linfoide, las demás son lesiones que siempre se reportan como anormales en caso de encontrarse en un estudio endoscópico y sus definiciones forman parte de la terminología estandarizada para CE.^{35, 36,37} (Tabla 3)

Se decidió incluir hiperplasia linfoide como una variable, a pesar de no ser un hallazgo patológico, porque trabajos previos sobre el impacto del VIH en el tracto gastrointestinal, han mostrado por íleo-colonoscopia diferencias en el tejido linfoide del íleon terminal, entre pacientes VIH negativos y positivos¹⁰.

Tabla 3. Definiciones de las variables reportadas en CE	
Variable	Definición
Eritema	Área en la mucosa con enrojecimiento plano, focal o difuso, sin vaso aparente, rodeado de vellosidades intestinales, sin ninguna otra modificación
Punto rojo	Área minúscula en la mucosa (menos de 1mm), puntual, plano, rojo brillante, sin vaso aparente, rodeado de vellosidades intestinales, sin ninguna otra modificación
Erosión	Pequeño defecto superficial de la mucosa, de color blanco o amarillo, con un borde plano
Úlcera	Defecto en la mucosa, con pérdida de continuidad en la misma.

Marcadores de atrofia	Reducción o ausencia de vellosidades
	Patrón mucoso en mosaico o festoneado
Hiperplasia linfoide	Nódulos pequeños (entre 2 y 10mm de diámetro) distribuidos en la mucosa del intestino delgado.

Tabla 3. Definiciones de las variables reportadas por CE.^{35, 36,37, 38}

Cada hallazgo reportado en un segmento intestinal, se cuantificó como una frecuencia y se le asignó el valor de 1.

En caso de identificar algún hallazgo incidental con trascendencia clínica durante la revisión de la CE, éste fue comunicado telefónicamente al paciente y como parte del protocolo se le ofreció una consulta presencial con un médico especialista.

Toma de muestra de sangre

Todas las punciones se realizaron por personal de salud capacitado, específicamente flebotomistas adscritos al área de toma de muestra del CIENI. Se utilizó material estéril, desechable y se implementaron las precauciones universales tanto para el participante, como para el tomador de la muestra.

El volumen total de sangre donada fue de máximo 50ml por punción.

La muestra de sangre para investigación fue de 15ml (2 tubos) y se recolectó en tubos BD Vacutainer® para suero. Las muestras fueron inmediatamente transportadas al laboratorio, donde se permitió la formación del coágulo durante 20 minutos. El suero fue separado por centrifugación (1,500 rpm, 10 minutos, a temperatura ambiente) y se dividió en alícuotas que se almacenaron en varios tubos de 250µl, congelados a -80°C hasta su uso.

Los estudios que se realizaron con fines de investigación fueron: carga viral para VIH, prueba diagnóstica de VIH por Western blot y ELISA, medición de población linfocitaria (CD4 y CD8), medición de interleucina 6 (IL-6), medición de PCR y medición de marcadores indirectos de: translocación bacteriana (CD14 soluble), activación de monocitos (CD163 soluble), y de daño a la barrera intestinal (I-FABP).

Como parte del seguimiento clínico y como un beneficio para los participantes, en la misma punción también se incluyó una muestra para química sanguínea, perfil de lípidos, pruebas de función hepática, biometría hemática, anticuerpos para hepatitis B y C y anticuerpos por citomegalovirus; los cuales fueron evaluados por el médico tratante de cada paciente.

Cuantificación de marcadores indirectos de translocación bacteriana, activación de monocitos, daño a barrera epitelial e inflamación

Este procedimiento fue realizado por químicos fármaco biólogos con amplia experiencia.

Todos los marcadores se midieron en suero, el cual, se descongeló a temperatura ambiente, se clarificó por centrifugación a 14,000 x *g* a 4°C por 10 minutos y se comenzó cada ensayo inmediatamente. Para evitar ciclos de descongelación y re congelación, se utilizó un tubo de suero por cada ensayo

Se empleó la técnica de ELISA en su modalidad sándwich para cuantificar los marcadores indirectos de translocación bacteriana (sCD14), activación de monocitos (sCD163), de daño a barrera epitelial (I-FABP) e inflamación (PCR e interleucina 6). sCD14 sCD163 y PCR se determinaron utilizando los reactivos Human sCD14, sCD163 y PCR Quantikine ELISA (R&D, Minneapolis, Minnesota, USA), respectivamente. El kit I-FABP, Human, ELISA (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) se usó para medir la proteína intestinal de unión a ácidos grasos y el

kit IL-6, Human, ELISA, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific Invitrogen, Viena, Austria) para medir interleucina 6. Estos ensayos se realizaron en microplacas de 96 pozos, en las que se corrieron 40 muestras, 7 estándares y un blanco por duplicado. En el caso de sCD14, sCD163 y PCR las microplacas se leyeron a absorbancias de 450 nm y 570 nm para la corrección de longitud de onda; para I-FABP e IL-6 no es necesaria dicha corrección de acuerdo con el fabricante, por lo que la placa sólo se leyó a una absorbancia de 450nm. Se utilizó un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek, Winooski, Vermont, USA) y los datos se analizaron en el software Gen5 2.07 de BioTek (Winooski, Vermont, USA). Se generaron las curvas estándar para cada uno de los analitos mediante modelos lineales (Gen5 2.07). En cada curva estándar en el eje de las ordenadas se grafica la absorbancia y en el eje de las abscisas la concentración de cada analito (Anexos 13,14,15,16 y 17).

Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexos 8,9,10,11 y 12) y las curvas estándares se generaron por dilución serial (1:2) a partir del estándar liofilizado correctamente reconstituido. El suero se diluyó 1:250, 1:25, 1:5 para sCD14, sCD163 y PCR respectivamente, y 1:2 para I-FABP e IL-6. Las muestras de los 2 tiempos del estudio por paciente se corrieron en una misma placa, para evitar variaciones intrínsecas a cada ensayo (fluctuaciones en la temperatura, pipeteo, etc.). Todas las muestras se realizaron por duplicado y el valor promedio se utilizó como referencia. Se verificó que el coeficiente de variación de las dos determinaciones (duplicado por muestra) fuese inferior al 15%, como lo indica el fabricante, y de menos del 20% en el caso de IL-6.

Recolección de heces

Esta muestra se solicitó con fines clínicos, para descartar enteritis bacterianas (*Salmonela*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*) y en caso de diagnosticarlas, excluir al paciente e indicarle el tratamiento apropiado. Fue recolectada por el propio participante y procesada en el laboratorio de microbiología del INER. Se realizaron coproparasitoscópico y coprocultivo en caso de diarrea.

Cálculo de muestra y análisis estadístico

Para comparar la prevalencia de hallazgos en intestino delgado identificados por CE en participantes VIH positivo y VIH negativo, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$) y una potencia de prueba del 80% ($\beta = 0.20$), utilizando como referencia el trabajo de Sakai y colaboradores³² en el que se reportó una prevalencia de 55% (P1) en pacientes VIH positivos y del 10% (P2) en participantes VIH negativos, se calcularon 13 sujetos por grupo. (<http://www.winepi.net/f108.php>)

Para el análisis estadístico descriptivo, se utilizaron como medidas de tendencia central la mediana y los rangos mínimos y máximos, porque dado el tamaño de la n, no fue posible demostrar la normalidad en la distribución de los datos. Para el análisis inferencial, en un principio se consideró utilizar la Prueba T de Student para variables pareadas (antes y después) y para variables independientes (casos y controles), pero dado el tamaño de la muestra, se

decidió utilizar la suma de rangos de Wilcoxon para muestras pareadas y para variables independientes, como pruebas no paramétricas.

RESULTADOS

Entre el 1 de marzo del 2019 y el 1 de febrero del 2020, se realizaron 10 estudios de CE, en seis sujetos diferentes: cinco con diagnóstico reciente de VIH y uno seronegativo. En todos los casos, la donación de las imágenes por videoendoscopia estuvo acompañada de la correspondiente muestra de sangre y de heces.

A cuatro participantes, con diagnóstico reciente de VIH, se les hizo CE antes y después del inicio del tratamiento antirretroviral. En un paciente seropositivo, se realizó el estudio únicamente antes de iniciar el tratamiento, porque a pesar de contactarlo y agendar cita para la toma de muestra no acudió. También se reclutó un sujeto del grupo control (VIH negativo), al que se le realizó una cápsula.

Descripción de la cohorte VIH positiva

Este grupo está formado por cinco participantes. Por tratarse de una muestra pequeña, se utilizaron como medidas de tendencia central, la mediana y los rangos mínimos y máximos.

La mediana de edad fue de 23 años, con un rango entre 19 y 34 años. La del peso fue de 69.3 kilos, con un rango entre 51.7 y 80 kilos, y del IMC 24.2 kg/m² con un rango mínimo de 19.2 y máximo de 26.7 kg/m². (Tabla 4)

Tabla 4. Edad, peso e Índice de Masa Corporal de los participantes VIH positivos			
ID	Edad (años)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)
1	23	69.3	24.2

2	29	80	26.7
3	34	72.3	26
4	19	51.7	19.2
5	19	53.9	20.2
Mediana (min,max)	23 (19,34)	69.3 (51.7,80)	24.2 (19.2,26.7)

Tabla 4. Edad, peso e IMC de los participantes VIH positivos. La mediana y el rango mínimo y máximo son las medidas de tendencia central.

Cuatro pacientes se diagnosticaron en etapa Fiebig V, y uno en Fiebig IV. La mediana de días entre el diagnóstico de VIH y el inicio del tratamiento antirretroviral fue de 14, con un rango mínimo y máximo de 6 y 30 días respectivamente. La segunda cápsula, se realizó una vez que los pacientes alcanzaban una carga viral indetectable o menor a 40 copias/mL, y acudían a su cita para la toma de muestras. Este tiempo fue variable en cada participante. La mediana del tiempo en que los pacientes lograron una carga viral indetectable fue de 134 días, con un rango entre 91 y 202 días. La mediana entre esta fecha, y en la que se realizó la segunda CE fue de 58 días, con un rango entre 6 y 83 días.

Dos participantes refirieron diarrea en algún momento de su seguimiento. (Tabla 5)

Tabla 5. Características clínicas de los participantes VIH positivos.						
ID	Fiebig al diagnóstico	Tiempo entre diagnóstico e inicio de TAR (días)	Tiempo entre inicio de TAR y CV indetectable (días)	Tiempo entre CV indetectable y 2da cápsula (días)	Tiempo entre inicio de TAR y 2da cápsula (días)	Síntomas Gastrointestinales
1	V	30	85	6	91	Ninguno
2	V	11	90	79	169	Ninguno
3	V	14	117	83	200	Diarrea

4	IV	14	133	No acudió	No acudió	Diarrea
5	V	6	61	37	98	Ninguno
Mediana (min,max)	NA	14 (6,30)	90 (61,133)	58 (6,83)	133 (91,200)	NA

Tabla 5. Características clínicas de los participantes VIH positivos. La mediana y el rango mínimo y máximo son las medidas de tendencia central.

La mayoría de los participantes iniciaron el tratamiento antirretroviral con una cuenta de linfocitos T CD4+ mayor a 250 células/mm³. Sólo un paciente tuvo cifras menores a este valor (117), y fue el que más tiempo demoró en lograr una carga viral indetectable (133 días). La mediana de CD4+ antes de iniciar TAR fue de 578 células/mm³, con un rango entre 170 y 661. Los valores de linfocitos T CD8+, estuvieron en un rango entre 457 y 2274 células/mm³, y una mediana de 1163 antes del tratamiento. Todos los participantes alcanzaron cifras normales de linfocitos T CD4+ (es decir, mayores a 500 células/mm³), una vez que lograron cargas virales menores a 40 copias/ml. (Tabla 7)

La terapia antirretroviral fue indicada por el médico tratante de cada paciente. En cuatro casos consistió en un inhibidor de la integrasa combinado dos INTRs. En dos pacientes fue dolutegravir/abacavir/lamivudina, y en otros dos BIC/ emtricitabina/tenofovir. Un paciente recibió tratamiento con tres inhibidores de la transcriptasa reversa por diferentes mecanismos (efavirenz/tenofovir/emtricitabina). (Tabla 6)

Tabla 6. Linfocitos T CD4+, CD8+ y CV antes y después de TAR en los participantes VIH positivos.							
ID	Antes de TAR			Con TAR			TAR
	CD4	CD8	CV	CD4	CD8	CV	
1	649	1163	184,129	864	1763	<40	TDF, FTC, EFV

2	432	2274	6,940,920	883	1452	<40	ABC, 3TC, DTG
3	578	2051	1,005,890	1115	1180	<40	ABC, 3TC, DTG
4	170	457	6,273,073	1073	892	<40	BIC, FTC, TAF
5	661	851	126,487	976	1609	<40	BIC, FTC, TAF
Mediana (min-max)	578 (170- 661)	1163 (457-2274)	1,005,890 (126,487- 6,940,920)	976 (864-1115)	1452 (892- 1763)		

Tabla 6. Linfocitos T CD4+, CD8+ y carga viral antes y después del tratamiento antirretroviral en los participantes VIH positivos. Los valores de CD4+ y CD8+ se presentan en células/mm³ y los de carga viral en copias/mm³. Los valores de CD4+ y CD8+ en la columna con tratamiento antirretroviral corresponden al día en que se documentó una carga viral menor a 40 copias/mm³. Se considera como carga viral indetectable cuando se reportan menos de 40 copias/mm³. Los esquemas de terapia antirretroviral referidos corresponden a: TDF,FTC,EFV es Tenofovir lisopropil fumarato, Emtricitabina, Efavirenz (Atripla®); ABC,3TC,DTG es Abacavir, Lamivudina, Dolutegravir (Triumeq®), y BIC,FTC,TAF es Bictegravir, Emtricitabina, Tenofovir (Biktarvy®). Se utilizan la mediana y el rango mínimo y máximo como medidas de tendencia central.

En cuanto a los resultados de los coprocultivos y coproparasitoscópicos, cuatro muestras fueron negativas, en cinco se reportó Endolimax nana y en una Blastocystis hominis. Blastocystis hominis es una bacteria que se considera parte de la flora del tracto digestivo, en el caso de Endolimax nana, su erradicación se realiza cuando el paciente refiere síntomas gastrointestinales. Los estudios de cápsula endoscópica se reportaron normales aún en pacientes con Endolimax nana documentado.

Hallazgos por cápsula endoscópica

En la primera CE el estudio se consideró sin alteraciones en cuatro pacientes (Figura 9). En uno, se documentó edema, hiperemia y erosiones en duodeno y en yeyuno (Figura 10). En los cinco casos, el segmento intestinal del íleon no presentó cambios macroscópicos.



Figura 9. Imágenes del intestino delgado sin alteraciones, obtenidas por CE en cuatro pacientes VIH positivos antes de iniciar tratamiento antirretroviral. Las imágenes de A1 a A4 corresponden a duodeno; de B1 a B4 a yeyuno y de C1 a C4 a íleon. Las imágenes con el mismo número, corresponden a un mismo paciente.



Figura 10. Imágenes del intestino delgado, obtenidas por CE en un paciente VIH positivo, antes de iniciar tratamiento antirretroviral. En el recuadro A se observan erosiones del duodeno (dentro del círculo azul). El recuadro B muestra edema e hiperemia en yeyuno, y la imagen C corresponde a íleon sin alteraciones.

Por el contrario, en la segunda cápsula, sólo un paciente tuvo un estudio sin hallazgos. (Figura 11).

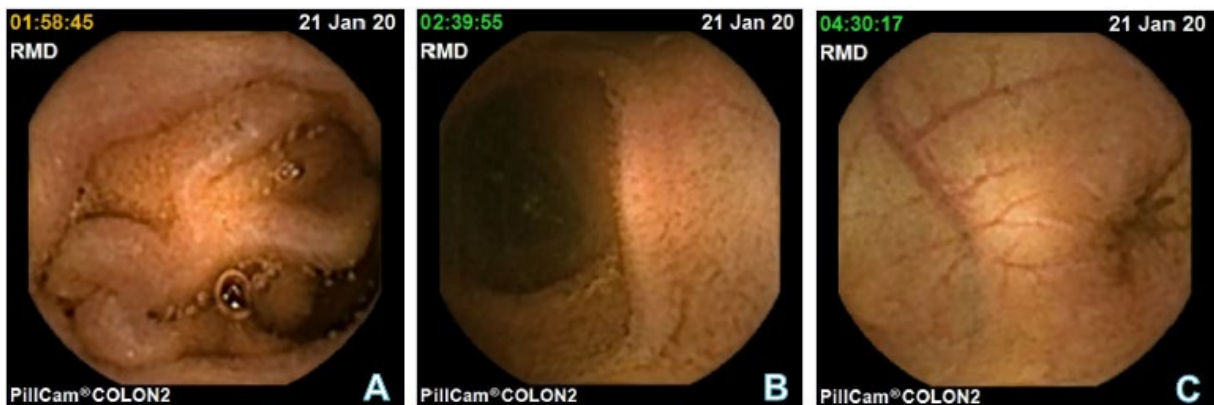


Figura 11. Imágenes del intestino delgado obtenidas por CE en un paciente VIH positivo con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable. La imagen etiquetada con la letra A corresponde a duodeno; la B a yeyuno y la C a íleon. Los tres segmentos intestinales se observan sin alteraciones.

En el siguiente gráfico (Figura 12) se comparan los segmentos intestinales sin hallazgos patológicos encontrados en la primera y segunda CE. Como ya se mencionó, llama la atención que en todos los estudios realizados sin TAR, el íleon se observa sin alteraciones y pasa lo mismo con duodeno y yeyuno en cuatro casos (80%). En la segunda cápsula, estos hallazgos se repiten únicamente en un paciente.

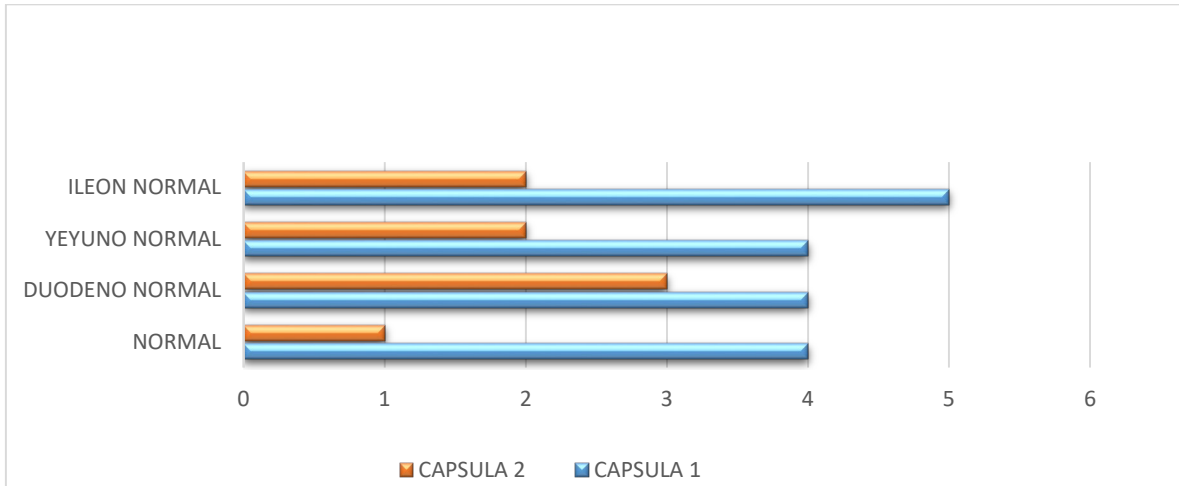


Figura 12. Gráfico de barras apiladas de los segmentos intestinales sin hallazgos patológicos por CE, antes y después de recibir terapia antirretroviral. En el eje de las abscisas se indica el número de estudios endoscópicos y en el eje de las coordenadas los segmentos intestinales sin alteraciones. En azul, se muestran los resultados correspondientes a la cápsula realizada sin terapia antirretroviral y en naranja, una vez alcanzada la carga viral indetectable.

El resto de los participantes (tres), presentaron alteraciones en duodeno, en yeyuno o en íleon. El paciente que en la primera cápsula tuvo cambios en duodeno y yeyuno, persistió con estos hallazgos además de acortamiento de las vellosidades en yeyuno y edema e hiperemia en íleon; por lo que, se consideró que presentó enteritis en el segundo estudio endoscópico.

En uno de los pacientes que en la primera cápsula no tuvo cambios, en la subsecuente se observó edema, hiperemia y erosiones en yeyuno. Por último, en las imágenes de la segunda cápsula de otro de los participantes se documentó hiperplasia linfoide en íleon. (Figura 13).



Figura 13. Imágenes de los hallazgos en intestino delgado, obtenidas por CE en tres pacientes VIH positivos con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable. Las imágenes etiquetadas con la letra A corresponden a duodeno; con la letra B a yeyuno y con la letra C a íleon. Las imágenes con el mismo número, corresponden a un mismo paciente. Los símbolos indican: \oplus edema, \bullet hiperemia, * erosiones, \odot hiperplasia linfoide, α acortamiento de las vellosidades.

En resumen, los hallazgos encontrados en la segunda cápsula fueron: edema en duodeno (1), hiperemia en duodeno (1), erosiones en duodeno (1), erosiones en yeyuno (1), edema de yeyuno (2), hiperemia de yeyuno (2), edema en íleon (1), hiperemia en íleon (1) hiperplasia

linfoide en íleon (1) y acortamiento de vellosidades en yeyuno (1). En la siguiente gráfica de barras se comparan los hallazgos del primer estudio con los del segundo. (Figura 14)

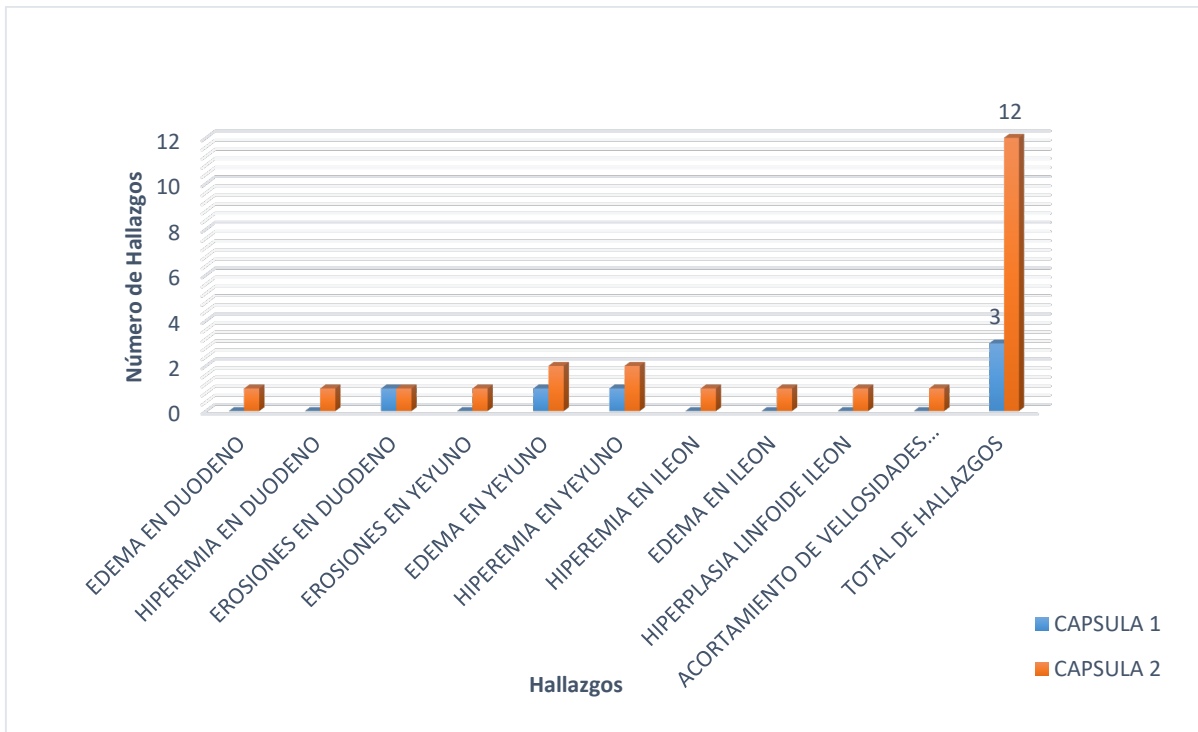


Figura 14. Gráfico de barras de los hallazgos por CE en pacientes VIH positivos, vírgenes a tratamiento antirretroviral y con tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable. En el eje de las abscisas se enlistan los hallazgos y en el eje de las coordenadas la frecuencia en que se presentaron. En azul, se muestran los resultados correspondientes a la cápsula realizada sin terapia antirretroviral (cápsula 1) y en naranja, una vez alcanzada la carga viral indetectable (cápsula 2).

El total de hallazgos por CE en el intestino delgado antes y después del tratamiento antirretroviral fue de cinco y doce respectivamente ($p=0.08$, prueba de los rangos con signo de Wilcoxon) (Tabla 7).

Tabla 7. Hallazgos totales y por segmento del intestino delgado antes y después del TAR.								
ID	Duodeno		Yeyuno		Íleon		Hallazgos totales	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
1	s/a	s/a	s/a	Edema Hiperemia Erosiones	s/a	s/a	0	3
2	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	Hiperplasia linfoide	0	1
3	Erosiones	Edema Hiperemia Erosiones	Edema Hiperemia	Edema Hiperemia Acortamiento de vellosidades	s/a	Edema Hiperemia	3	8
4	s/a	No acudió	s/a	No acudió	s/a	No acudió	0	No acudió
5	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	0	0
Suma de hallazgos							3	12
							p = 0.08*	

Tabla 7. Hallazgos totales y por segmento del intestino delgado antes y después del tratamiento antirretroviral. Se utiliza s/a para indicar "sin alteraciones". Se encontraron en total tres hallazgos en el estudio endoscópico realizado sin tratamiento antirretroviral, y diez en el estudio subsecuente. *Se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

El TAR indicado en los dos pacientes que tuvieron hallazgos compatibles con daño epitelial en la CE (participantes 1 y 3) era distinto. En el primer caso fue TDF/FTC/EFV y en el segundo ABC/3TC/DTG. El paciente con el estudio de CE normal, estaba tratado con BIC/FTC/ TAF.

Durante la revisión de los estudios endoscópicos, también se encontraron algunos hallazgos en otros órganos del tracto gastrointestinal diferentes al intestino delgado. Aunque no era el objetivo de la investigación, se reportaron en la interpretación de las CE y en el caso de ser clínicamente relevantes, se les comunicó a los participantes y se les orientó para su manejo y

seguimiento correspondiente. Los hallazgos extraintestinales fueron: erosiones gástricas, divertículo ileal, pólipo en yeyuno, erosiones en colon y sangrado activo en colon.

Marcadores séricos

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las mediciones séricas de la Proteína C Reactiva (PCR), de la proteína de unión a ácidos grasos-intestinal (I-FABP), del CD14 soluble (sCD14), del CD163 soluble (sCD163) y de la interleucina 6 (IL-6) antes y después del tratamiento antirretroviral. (Tabla 8)

En el caso de la muestra de sangre del paciente que no acudió a seguimiento, el coeficiente de variación de las dos determinaciones de IL-6 (duplicado por muestra), fue mayor del 20% por lo que el resultado no se reportó. De acuerdo con el fabricante, la variabilidad entre las dos mediciones debe de ser inferior al 20% para considerarse adecuada.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas para comparar los valores obtenidos en las dos mediciones. Los resultados de esta comparación deben de ser interpretados con cautela porque la n de los grupos es muy pequeña. Sin embargo, llama la atención que en el caso del I-FABP, el marcador que indica de manera indirecta daño al epitelio intestinal, se obtuvo un valor de p cercano a 0.05 ($p=0.06$), posiblemente debido al incremento de casi diez veces en el paciente tres. (Tabla 8).

El comportamiento de este marcador indirecto de daño epitelial, a diferencia de los otros marcadores, fue similar en todos los pacientes y en los cuatro casos se incrementó en la segunda toma. Tanto la mediana, como los rangos mínimos y máximos aumentaron de la

primera a la segunda muestra, es decir, con el inicio del TAR. El resto de los marcadores (PCR, sCD14, sCD163 e IL-6) no mostró esta uniformidad en sus resultados.

Para observar el comportamiento de los marcadores séricos antes y después del tratamiento antirretroviral se realizaron los siguientes gráficos, en los que se muestra si existió un aumento o una disminución de los valores del marcador sérico por paciente, cuando su carga viral era indetectable con al menos tres meses de tratamiento antirretroviral. (Figura 15)

En el caso de la PCR, aumentó en dos participantes; el incremento fue notorio en uno de ellos, y en los otros dos disminuyó. (Figura 15A)

El sCD163 bajó en dos sujetos, subió en uno, y se mantuvo prácticamente igual en otro. (Figura 15B)

El sCD14 descendió en tres pacientes y en uno ascendió. (Figura 15C)

El I-FABP fue el único marcador sérico en el que se observó un comportamiento similar en todos los participantes porque en los cuatro casos se incrementó. En tres, los valores de la segunda muestra se mantuvieron cercanos al basal y entre ellos, y en uno la diferencia fue evidente. (Figura 15D)

La IL-6 disminuyó en tres participantes, y aumentó de manera muy evidente en uno. Su comportamiento por paciente, se observó similar al de la PCR, y en el mismo paciente los dos marcadores aumentaron de forma notoria. (Figura 15E)

Tabla 8. Marcadores séricos de los participantes VIH positivo antes de iniciar tratamiento antirretroviral y después de alcanzar carga viral indetectable con tratamiento antirretroviral.

Paciente	PCR (ng/mL)		sCD163 (ng/mL)		I-FABP (pg/mL)		IL-6 (pg/ml)		sCD14 (pg/mL)	
	Sin TAR	Con TAR	Sin TAR	Con TAR	Sin TAR	Con TAR	Sin TAR	Con TAR	Sin TAR	Con TAR
1	2731.262	1844.631	1126.901	819.996	137.967	702.401	1.7	1.257	1409843.575	2098721.004
2	1237.897	13115.25	1512.235	866.428	588.799	761.524	1.64	5.522	2333319.104	1938190.146
3	1590.924	3495.902	929.644	893.447	263.886	2278.118	0.866	0.313	1609896.337	1507916.326
4	2855.871	No asistió	1068.239	No asistió	1054.647	No asistió	No determinada	No asistió	1960612.394	No asistió
5	4898.077	1089.965	347.858	403.073	303.212	550.67	3.354	0.838	1664594.548	1263329.064
Mediana (min,max)	2161.09 (1590.924-4898.077)	2670.26 (1089.965-3495.902)	1097.57 (1512.235-929.644)	843.21 (819.996-893.447)	426.342 (137.967-1054.647)	731.96 (550.67-2278.118)	1.67 (0.866-3.354)	1.04 (0.313-5.522)	1785254.37 (1409843.575-2333319.104)	1723053.236 (1263329.06-2098721.00)
	p=0.71*		p=0.27*		p=0.06*		p=0.71*		p=0.71*	

Tabla 8. Marcadores séricos de cada participante antes de iniciar tratamiento antirretroviral y después de alcanzar carga viral indetectable con tratamiento antirretroviral. PCR proteína C reactiva, sCD14 CD14 soluble, I-FABP proteína de unión a ácidos grasos-intestinal, sCD163 CD163 soluble, IL-6 interleucina 6. En el caso de la medición de IL-6 en el paciente 4, el coeficiente de variabilidad fue mayor a 20% entre las dos mediciones, por lo que no se obtuvo un resultado confiable. Se utilizaron la mediana y el rango mínimo y máximo como medidas de tendencia central, y la prueba de Wilcoxon* para muestras pareadas para análisis inferencial.

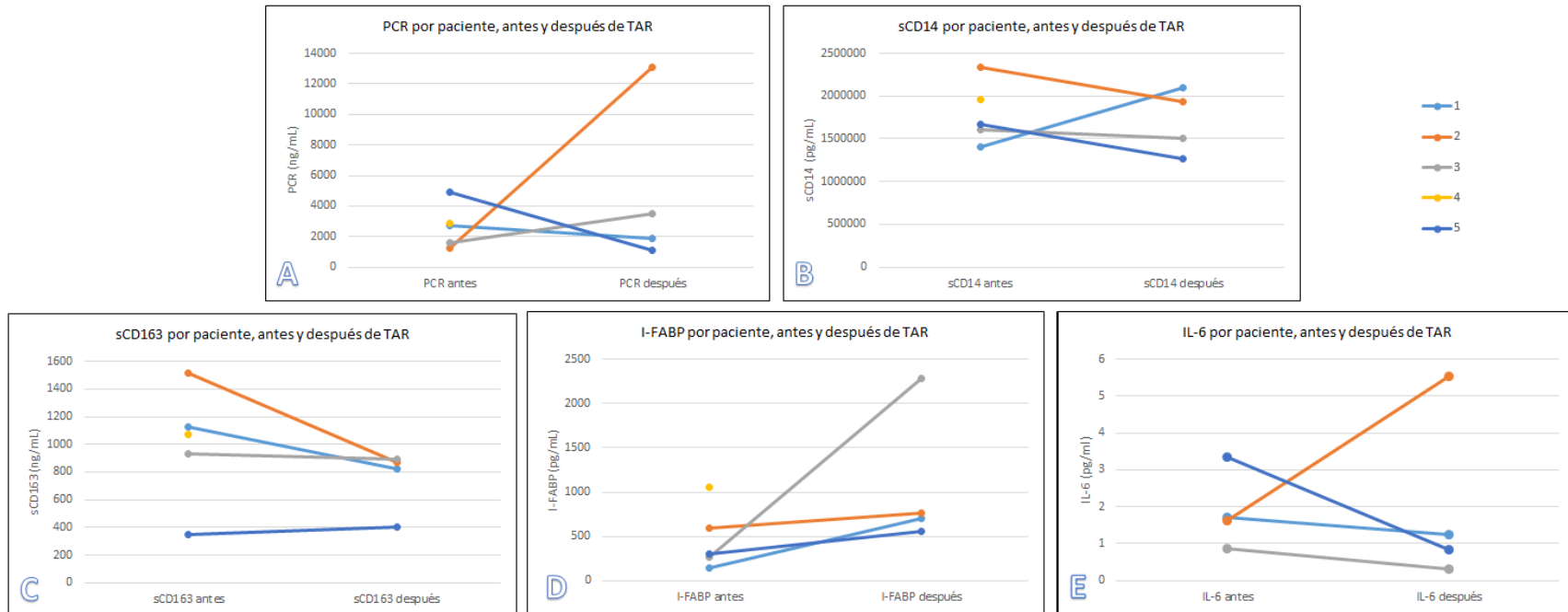


Figura 15. Marcadores séricos por paciente, antes y después de terapia antirretroviral. En el gráfico A se muestran los valores de la Proteína C Reactiva, en el recuadro B de CD14 soluble, en el C de CD163 soluble, en el D del péptido de unión a ácidos grasos-intestinal y en el E de interleucina-6. Cada color representa a un paciente. En el caso del paciente cuatro (color amarillo), de A-D sólo se muestra una medición porque no acudió a seguimiento, y en E no aparece porque su resultado de la muestra basal no fue válido.

Asociaciones entre marcadores séricos y hallazgos por CE

La posible correlación entre la cuantificación de los marcadores séricos de daño al epitelio, inflamación y translocación microbiana y el número de hallazgos endoscópicos, independientemente del número de muestra al que pertenezcan los valores, se explora en los siguientes gráficos de dispersión que comparan el total de hallazgos de cada participante con el resultado de PCR, de sCD14, de sCD163, de I-FABP y de IL-6. (Figura 16)

En las gráficas de PCR, sCD14, sCD163 la correlación es nula (Figura 16 A, B y D), pero en la de I-FABP (Figura 16C) se observa una posible correlación lineal positiva y en la de IL-6 (Figura 16E) una posible correlación lineal negativa.

Al graficar el número de linfocitos T CD4+ y el número de hallazgos por CE no encontramos alguna relación. (Figura 17)

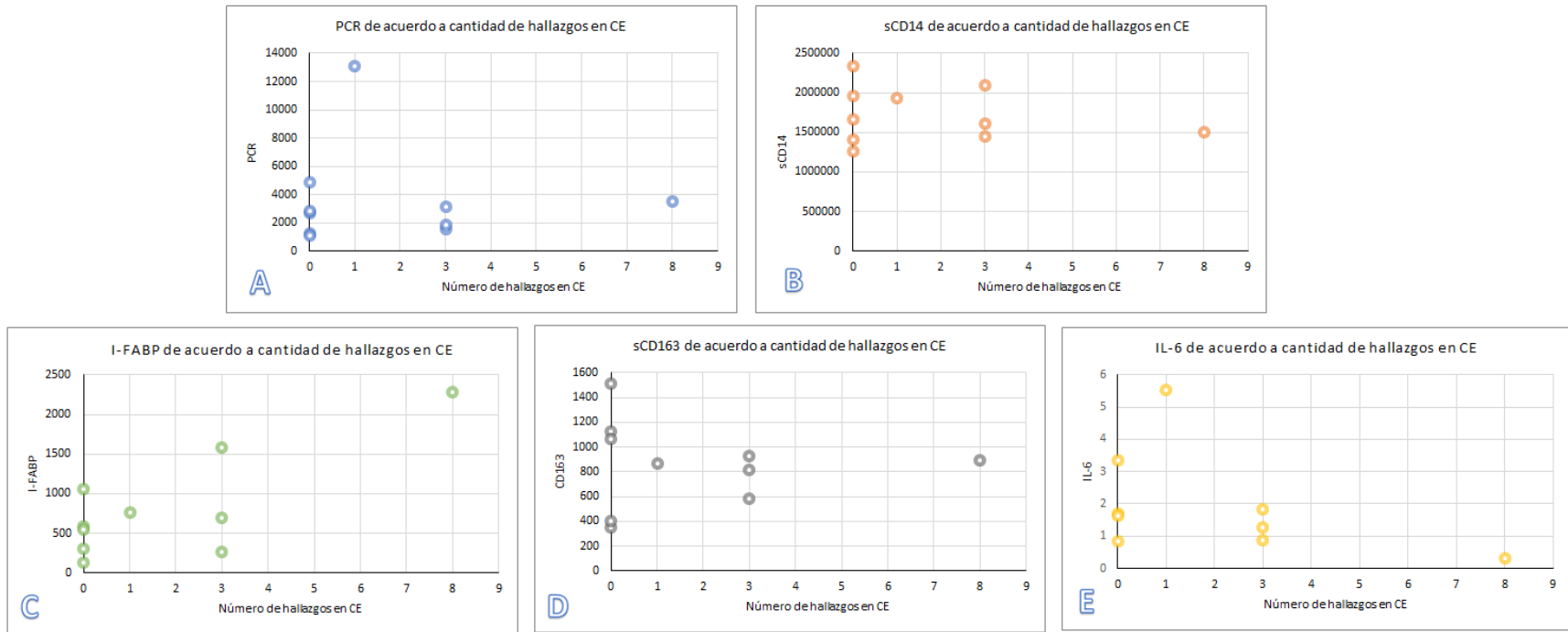


Figura 16. Gráficos de dispersión entre los marcadores séricos y la cantidad de hallazgos endoscópicos. En el eje de las abscisas se encuentra el número de hallazgos por cápsula endoscópica y en el eje de las ordenadas los valores medidos del marcador sérico correspondiente. En el gráfico A se presentan los valores de Proteína C Reactiva, en el gráfico B de CD14 soluble, en el gráfico C del péptido de unión a ácidos grasos-intestinal, en el gráfico D de CD163 soluble y en el E de la interleucina 6.

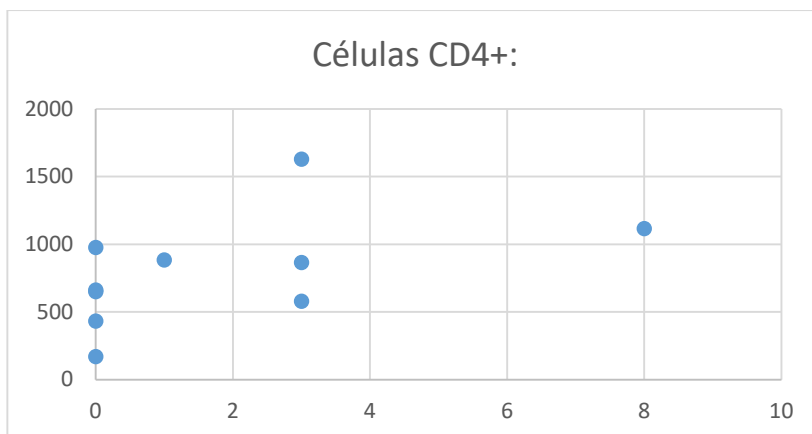


Figura 17. Gráfico de dispersión entre la cuenta de linfocitos T CD4+ y el número de hallazgos por CE. En el eje de las abscisas se encuentra el número de hallazgos por cápsula endoscópica y en el eje de las ordenadas la cantidad de CD4+

La proporción en que se modificaron los valores de los marcadores séricos y de los hallazgos por CE entre una y otra medición, en cada uno de los pacientes, se muestra en las siguientes gráficas de barras. En ninguno de los casos se observó un comportamiento homogéneo entre los marcadores y tampoco en relación con el número de hallazgos. (Figura 18)

En el paciente uno, los hallazgos se observaron en el segundo estudio, lo cual coincide con el incremento de más de cinco veces del valor basal de I-FABP. El sCD163, también se incrementó discretamente, (menos de dos veces el valor de la primera muestra), y los otros tres marcadores séricos presentaron una variación mínima. Este paciente estaba tratado con TDF/FTC/RFV (Figura 18A)

En el segundo paciente, los hallazgos endoscópicos también se encontraron en la segunda cápsula, y en este caso el incremento más evidente fue de la PCR (más de 10 veces su valor basal), seguida de la IL-6 (que se triplicó). El I-FABP aumentó menos de una vez su valor inicial, y sCD163 y sCD14 disminuyeron discretamente. Este paciente recibió ABC/3TC/DTG como TAR. (Figura 18B)

El tercer paciente, mostró cambios en el intestino delgado desde la primera video cápsula; éstos persistieron y se duplicaron en el segundo estudio. Un comportamiento similar se observó en el I-FABP que aumentó 10 veces su valor, y en menor medida en la PCR que dobló su valor basal. sCD14 y sCD163 prácticamente no se modificaron, pero la IL-6 disminuyó más de la mitad, aunque su valor basal era menos de uno. Este paciente también recibió ABC/3TC/DTG de tratamiento. (Figura 18C)

Finalmente, el último participante que no presentó hallazgos en ninguno de los estudios endoscópicos, tuvo una disminución considerable de la PCR y de la IL-6 en la segunda muestra de sangre, pero no en el resto de marcadores séricos, e incluso I-FABP se incrementó levemente. Este paciente recibió BIC/FTC/TAF como TAR (Figura 18D)

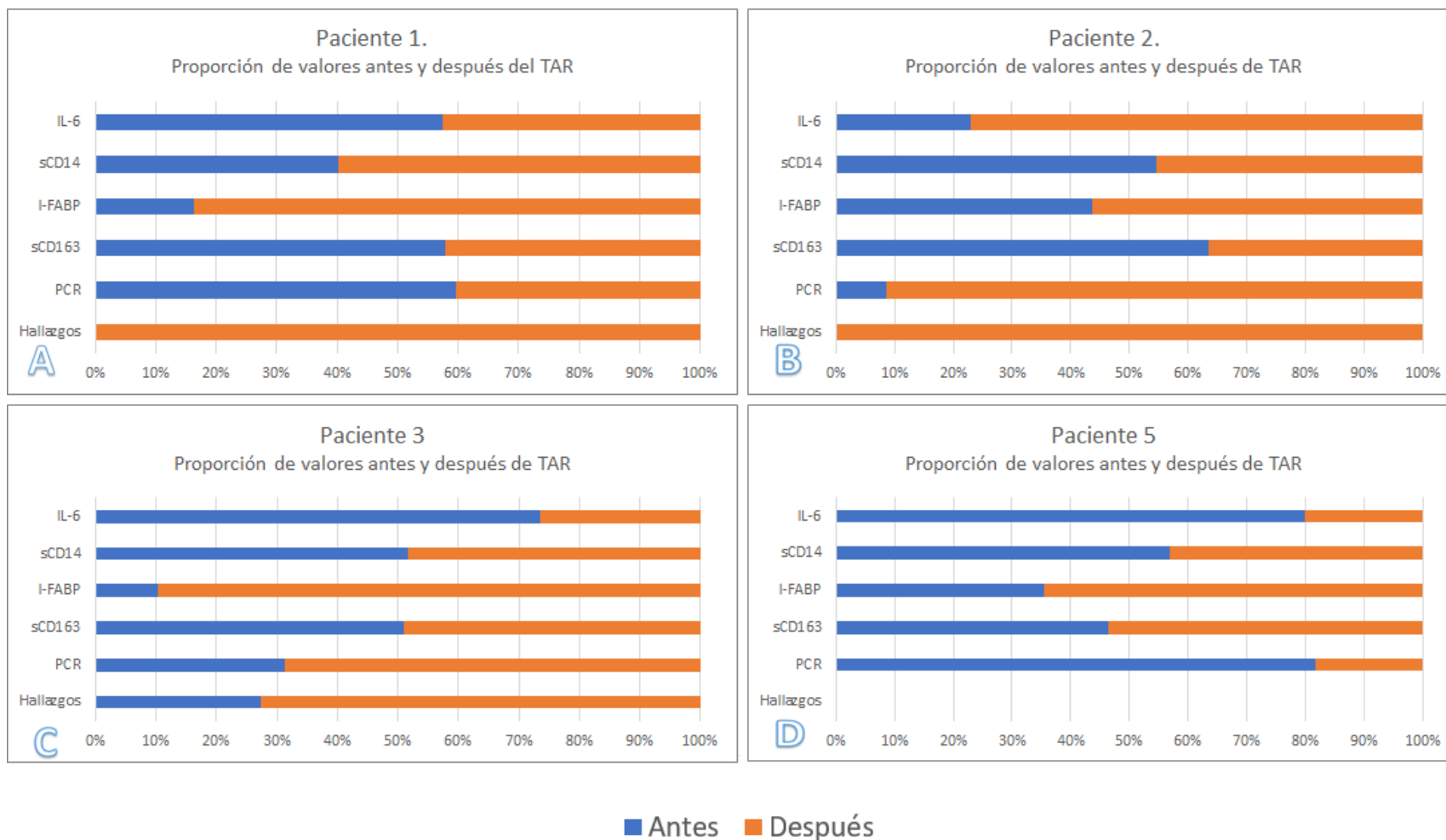


Figura 18. Gráfica de barras de cada participante con mediciones pareadas, que muestra la proporción del resultado de los marcadores séricos y de la cantidad de hallazgos por CE, correspondientes a antes y después del tratamiento antirretroviral.

Descripción del único participante en el grupo control (VIH negativo)

Se presentan los resultados de un participante aun cuando no son representativos del grupo control. Se trata de un sujeto de 39 años de edad, con un IMC de 26 kg/m², sin síntomas gastrointestinales. Su prueba de VIH fue negativa y su cuenta de linfocitos T CD4+ y CD8+ 1629 y 1152 respectivamente. En la CE se encontraron edema e hiperemia de duodeno y úlceras en íleon (Figura 19). Los resultados de los marcadores séricos fueron los siguientes: PCR 3169.867 ng/mL, sCD14 1444036.765 pg/mL, I-FABP 1586.629 pg/mL, sCD163 583.538 ng/mL, IL-6 1.821 pg/mL.



Figura 19. Imágenes de los hallazgos en intestino delgado, obtenidas por CE en un paciente VIH negativo. La imagen etiquetada con la letra A corresponde a duodeno con edema e hiperemia. La imagen con la letra B muestra yeyuno sin alteraciones y en la letra C se observa una úlcera en cicatrización en íleon.

DISCUSION

El 13 de marzo del 2020, como respuesta a la emergencia mundial y nacional, por el importante aumento de casos de infección por el virus SARS-CoV-2, el INER se convirtió en un hospital exclusivo para la atención de pacientes con COVID-19. Como consecuencia, cerró sus puertas al resto de la población incluyendo a los pacientes con VIH. La reconversión hospitalaria generó que la atención a los pacientes que acudían regularmente al CIENI cambiara a la modalidad por telemedicina, y la posibilidad de realizar procedimientos diagnósticos, terapéuticos y de investigación fue cancelada. Esta medida, además de las repercusiones en la atención clínica de los pacientes, suspendió el reclutamiento de voluntarios y participantes en todos los proyectos de investigación que estaban en curso, incluido este proyecto.

Se exploraron diferentes opciones para subsanar este hecho, e intentar concluir en tiempo y forma el plan que se había diseñado al inicio de esta investigación. La prioridad en todo momento, fue no exponer ni aumentar el riesgo de contagio de COVID-19 a los participantes, por lo que, de forma congruente con el semáforo epidemiológico de la Ciudad de México, se decidió cancelar el reclutamiento e iniciar el análisis de resultados con la información que se contaba.

Aunque los resultados no son contundentes, hay algunos puntos que por su relevancia son importantes de comentar.

- **La mayoría de las primeras cápsulas fueron normales y en todas el íleon se observó sin alteraciones**

El íleon es el segmento intestinal en el que las placas de Peyer, el tejido linfoide y la presencia de linfocitos T predomina, es el sitio de mayor replicación viral, que tiene como consecuencia la importante depleción de linfocitos T CD4+, los cuáles se reconstituyen pobremente a pesar del TAR²³.

Al ser un segmento accesible por colonoscopia, y por las características histológicas mencionadas, ha sido un segmento del intestino delgado estudiado y descrito en trabajos previos. Por ejemplo, Brenchley et al¹⁰ describieron en un paciente con VIH agudo, sin TAR, la ausencia de tejido linfoide discernible por endoscopia, y contrastaron esto, con la apariencia macroscópica del íleon terminal con grandes agregados linfoides que ellos describieron como normales en pacientes no VIH.

La hiperplasia linfoide nodular del tracto gastrointestinal, se caracteriza por la presencia de múltiples nódulos entre 2 y 10mm de diámetro, generalmente presentes en el intestino delgado (pero no exclusivo) e histológicamente se define por la presencia de linfocitos del manto, con centros germinales mitóticamente activos, hiperplásicos, localizados en la lámina propia y/o en la submucosa superficial.³⁸ Puede encontrarse en pacientes inmunocomprometidos o no, predomina en los niños, y generalmente su presencia no se considera de relevancia clínica, sin embargo, dado el antecedentes de publicaciones previas en relación con el VIH, se decidió incluirla como un hallazgo significativo en esta investigación.

La hiperplasia linfoide nodular se ha reportado hasta en el 20% de los pacientes con Inmunodeficiencia Común Variable³⁸ (enfermedad caracterizada por la disminución de inmunoglobulinas) ; y en pacientes con VIH el primer reporte fue en 1992, considerándola como una de las manifestaciones más temprana de la infección³⁹. Al ser el tracto digestivo uno de los sitios de entrada y replicación del virus, la presencia de hiperplasia linfoide nodular podría deberse al estímulo directo del GALT.

De manera interesante, en todos los pacientes el íleon fue normal antes de iniciar el TAR, y el hallazgo de hiperplasia linfoide, se observó en uno después de haber recibido TAR, contrario a lo descrito por Brenchley et al¹⁰.

En relación con el comportamiento de la hiperplasia folicular en otros compartimentos linfoides anatómicos en pacientes VIH, se ha descrito, que aparece como una manifestación temprana, que puede permanecer estable hasta por cuatro años o más, y después continuar con fragmentación de los folículos linfoides, atrofia y finalmente depleción de los mismos³⁹. En el tracto digestivo, en los pacientes con alguna inmunodeficiencia, se ha postulado que la hiperplasia nodular linfoide es el resultado de un intento por compensar el funcionamiento inadecuado del GALT y sucede por la acumulación de precursores de células plasmáticas debido a un defecto en la maduración de los linfocitos B. ^{38, 40}

Con técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que, en la hiperplasia linfoide nodular, los folículos del intestino delgado están compuestos predominantemente de

células B (CD20+ y CD79+) y únicamente en los espacios interfoliculares se encuentran células T (CD5+CD3+ o CD5-CD3+). Además, la mayoría de las células de los centros germinales, son positivas para CD10, que es expresado por las células B; y se encuentran en proliferación activa (Ki-67 positivo).

En un reporte en población mexicana, realizado en un centro de tercer nivel, se reportaron por endoscopia y se confirmaron histológicamente 18 casos de hiperplasia linfoide nodular en 5 años. La mitad de estos casos correspondía a pacientes con alguna inmunosupresión, pero en ningún caso VIH. Las principales indicaciones clínicas para el abordaje diagnóstico fue la presencia de diarrea, pérdida de peso involuntaria y dolor abdominal.⁴¹

Llama la atención que en el paciente que presentó hiperplasia linfoide, ésta fue el único hallazgo endoscópico que se encontró, y con fines clínicos, la CE se reportaría dentro de la normalidad; sin embargo, el hallazgo de hiperplasia linfoide coincide con los valores de PCR y de IL-6 más altos de toda la cohorte, pero con valores de I-FABP muy cercanos a los basales (considerados como normales); lo cual indirectamente refiere un proceso inflamatorio inespecífico, sin daño o ruptura del epitelio intestinal.

En relación con otros cambios en el intestino secundarios a la infección por VIH reciente, que se esperaba observar endoscópicamente, se sabe que investigaciones que se realizaron en la década de los noventa⁴² para intentar establecer el mejor abordaje diagnóstico para los pacientes con diarrea y VIH, mostraron que en pacientes con VIH agudo con una cuenta de linfocitos T CD4+ mayor a 150-200 células/mm³ (como los pacientes de esta cohorte), no se identificaban cambios endoscópicos en el intestino

delgado (duodeno e íleon), y que la principal manifestación de enfermedad por VIH en el intestino estaba asociada con la presencia de enfermedades oportunistas y malignas⁴³.

Sin embargo, dado los trabajos posteriores que mostraron la importancia del intestino delgado en la entrada y replicación del virus, y que la lesión de la mucosa asociada al VIH es la atrofia de vellosidades por hiperplasia de las criptas²⁴, se podía esperar que hubieran cambios endoscópicos (en la estructura de las vellosidades) en los segmentos intestinales que no se habían explorado.

- **En la segunda cápsula (después de TAR) los hallazgos aumentaron**

La respuesta del intestino delgado enfermo al TAR, no ha sido completamente caracterizada. En este trabajo, en el caso del único paciente con hallazgos patológicos en duodeno y yeyuno antes del TAR, cuando se realizó el segundo estudio, además de no observar mejoría, se agregaron otros (acortamiento de vellosidades) y se extendieron (al íleon), aún con carga viral indetectable y con 28 semanas de TAR. Este paciente inició ABC/3TC/DTG a los 14 días posteriores de confirmado el diagnóstico de VIH, con una cuenta de linfocitos T CD4+ mayor a 500, y alcanzó una carga viral indetectable con adecuada reconstitución inmune antes de las 17 semanas.

Otro paciente, con un intestino normal en la primera CE, en el segundo estudio (posterior a 13 semanas de TAR) presentó hallazgos patológicos en la mucosa del yeyuno (edema, hiperemia), sin presentar cambios en las vellosidades. Él, inició TDF/FTC/EFV a los 30 días del diagnóstico de VIH, en estadio V de Fiebig, con más de 600 linfocitos T CD4, y alcanzó una carga viral indetectable a las 12 semanas.

De acuerdo con lo publicado por Batman y colaboradores²⁴ en el 2016, podría haberse esperado que en la segunda cápsula, después del tratamiento antirretroviral los hallazgos en el intestino fueran similares a la normalidad. Ellos concluyeron que: entre los pacientes con TAR y los controles (no VIH) la longitud de la cripta era similar, y que, entre los pacientes VIH con y sin TAR, el índice de proliferación celular es mayor en los pacientes sin tratamiento.

Sin embargo, es importante resaltar algunas consideraciones de ese trabajo para la interpretación de los resultados: los 9 pacientes VIH positivo que incluyeron tenían microsporidium (y diarrea crónica); de los 34 pacientes con VIH y TAR, no se conoce cuánto tiempo llevaban con el tratamiento ni sus características inmunológicas basales ni al momento de las biopsias; los controles negativos a VIH, son retrospectivos, y se asume que no tenían la infección; las biopsias referidas son de yeyuno, pero no se explica en qué consistió el procedimiento quirúrgico o endoscópico para obtenerlas.

Durante la contingencia por COVID-19 (2020) se contactó a los dos pacientes que habían presentado hallazgos significativos en su segunda cápsula. Por teleconsulta se les invitó a participar en la realización de un tercer estudio de cápsula endoscópica y ambos aceptaron. Fue posible acudir a su domicilio, con transporte y personal de salud del INER y siguiendo todas las medidas de protección personal el procedimiento se hizo sin complicaciones. Por la particularidad de la situación, no fue posible obtener muestra de sangre ni de heces.

Posterior a su diagnóstico de VIH, los dos pacientes iniciaron TAR y tuvieron seguimiento clínico en el CIENI al menos durante seis meses. Ambos contaban con seguridad social por lo que tramitaron la entrega de medicamentos en sus unidades de adscripción. Cuando fueron contactados, ambos refirieron un adecuado apego al TAR. Su carga viral más reciente al momento de realizar la tercera cápsula era indetectable, y su conteo de linfocitos T CD4+ era mayor a 350 cel /mm³ (593 y 1092 respectivamente). No habían requerido hospitalizaciones ni intervenciones desde su diagnóstico de VIH y se refirieron asintomáticos en cuanto a síntomas gastrointestinales.

En el caso del primer participante, la segunda cápsula se había realizado 22 meses antes. Su tratamiento antirretroviral inicial había sido TDF/FTC/EFV (Atripla®), pero para la tercera cápsula llevaba 15 meses con BIC/FTC/TAF (Biktarvy®). En el segundo caso, inició tratamiento con Triumeq® (ABC, 3TC, DTG) y a los tres meses se optimizó a BIC/FTC/TAF (Biktarvy®); cuando se realizó la tercera cápsula, a los 15 meses de la segunda, tenía 19 meses con este tratamiento.

En los dos pacientes, el tercer estudio de cápsula endoscópica mostró los tres segmentos del intestino delgado con características normales. En ambos casos, se evidenció gastropatía aguda como hallazgo adicional. Es decir, que los cambios que se observaron incluso en las vellosidades intestinales, sugerentes de enteropatía, habían revertido. Esto podría sugerir, que, en algunos pacientes, los cambios agudos en el intestino delgado pueden persistir o aumentar con el inicio del TAR, pero que posterior a un año de adecuado apego al tratamiento mejoran; o, que el cambio de tratamiento a un inhibidor

de integrasa influyó sobre los hallazgos. Para confirmar esto y conocer cuánto tiempo persisten estas características en pacientes asintomáticos, sería interesante continuar con el seguimiento a largo plazo de estos pacientes.

- **El comportamiento del I-FABP sugirió tener una relación positiva con el número de hallazgos por CE**

La proteína de unión a ácidos grasos es una de las proteínas intracelulares de bajo peso molecular, necesaria para el transporte y metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga. Específicamente la I-FABP, abunda en el citoplasma de las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, y se libera rápidamente a la circulación cuando los enterocitos sufren algún daño o destrucción⁴⁴.

Se ha estudiado como un marcador de enfermedad intestinal, pero también se han tratado de establecer rangos fisiológicos en pacientes sanos. En un trabajo japonés, que incluyó a 61 voluntarios sanos, la concentración sérica de I-FABP reportada es de 1.1 ± 0.9 ng/mL, y establece 2 ng/mL (2000 pg/mL) o menos, como valor de referencia de la concentración de I-FABP en suero de individuos sanos⁴⁵. En una cohorte del CIENI⁴⁶, de 30 participantes HSH VIH negativos, con una mediana de edad de 31 años y un IMC de 25.6, en una medición transversal, la mediana del I-FABP fue de 725.07 pg/mL. (IQR 576. 79 pg/mL). Este resultado se encuentra dentro del rango sugerido por la publicación asiática.

En las diferentes mediciones que se obtuvieron en este trabajo, solamente una es mayor a 2000pg/mL, y corresponde a un paciente posterior a recibir TAR. La mediana de I-FABP en ambos grupos (antes y después de TAR) es menor a 2000pg/mL (426.34 pg/mL y 731.96 pg/mL respectivamente), con resultados similares a los obtenidos en el grupo de 30

pacientes del CIENI. Sin embargo, es interesante notar que en todos los pacientes aumenta el valor de I-FABP en la segunda medición, en comparación con su propio resultado basal, incluso hasta más de 5 veces en dos pacientes. Aunque esta diferencia no alcanza significancia estadística entre los dos grupos, posiblemente con una n mayor podría demostrarse.

Al observar la relación de I-FABP con el número de hallazgos por CE, los cuales indican daño en la mucosa del intestino delgado, el valor de I-FABP parece incrementarse cuando éstos aumentan; lo cual demuestra de manera indirecta, la afección de las células epiteliales, y posiblemente, con un número mayor de pacientes esta asociación sería contundente.

Como parte del trabajo realizado en el CIENI⁴⁶, mencionado previamente, también se reclutó a 30 pacientes con VIH crónico, sin tratamiento, y se les realizaron mediciones seriadas de I-FABP, (antes de iniciar TAR, a los dos meses y a los 6 meses), sin importar la carga viral que tuvieran. La mediana de I-FABP en la toma basal (T0) fue de 704.05 pg/mL, a los dos meses (T2) aumentó a 1761.21 pg/mL, y a los 6 meses (T6) y al año (T12) se mantuvo elevada en comparación con el basal (1502.45 pg/mL y 1161.49 pg/mL respectivamente). En la segunda toma de sangre, solamente 8 pacientes tenían carga viral <40 copias/mL, pero a los 6 meses el 85% ya estaba indetectable.

De manera similar a lo que sucedió con los pacientes estudiados en esta investigación, parece ser, que el inicio de TAR incrementa los valores de I-FABP, independientemente de la carga viral; y esto, coincide con un mayor número de hallazgos endoscópicos.

Aun cuando los valores de I-FABP se incrementan de una medición a otra, en su mayoría permanecen en el rango referido como “normal” en población sana. Podría ser interesante considerar para trabajos futuros, observar el comportamiento de marcadores específicos de inflamación intestinal como la calprotectina fecal, que deriva directamente de los neutrófilos, y que ha demostrado utilidad clínica con valores de corte estandarizados, para diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal, y con una correlación significativa con la actividad de la enfermedad demostrada por endoscopia⁴⁷.

- **El comportamiento de la IL-6 sugirió tener una relación negativa con el número de hallazgos por CE.**

La IL-6 se produce de manera rápida y transitoria en respuesta a infección y daño en el tejido, contribuye a la defensa del huésped estimulando reactantes de fase aguda, reacciones inmunes y la hematopoyesis. Después de que se forma localmente en el sitio de inflamación inicial, llega al hígado a través del torrente sanguíneo y en los hepatocitos estimula la formación de la PCR, del amiloide sérico A y de fibrinógeno entre otros; además de disminuir la producción de albúmina, transferrina y fibronectina. También juega un papel importante en la unión de la respuesta inmune innata con la adquirida, promueve la producción de anticuerpos (al inducir la diferenciación de células B activadas en células plasmáticas productoras de anticuerpos) y la diferenciación de células T CD4+ vírgenes y de células T CD8 en células T citotóxicas. ⁴⁸

IL-6 es una citocina inflamatoria que funciona como mediadora para notificar la ocurrencia de algún evento emergente, como una lesión por infección o algún daño tisular de cualquier etiología. En esta cohorte, su comportamiento en las muestras de antes y después de TAR, fue similar al de la PCR (lo cual es esperado, al ser un precursor de la misma), excepto en el tercer paciente, que fue el que más hallazgos tuvo y en el que el valor de IL-6 se redujo en la segunda muestra y el de PCR aumentó considerablemente. Además, al observar su relación con el número de hallazgos por CE (los cuales, muestran daño en el epitelio del intestino delgado) llama la atención que sus valores parecieran disminuir de manera inversamente proporcional, contrario a lo esperado, que aumentarían sus valores de acuerdo con el número de hallazgos.

En este trabajo, se muestra *in vivo*, la evidencia directa del daño epitelial en el intestino delgado. La mayor parte de los estudios en los pacientes con diagnóstico reciente de VIH, que aún no iniciaban TAR, no muestran por CE daño macroscópico en la mucosa del intestino, específicamente en íleon. En los pacientes con al menos 12 semanas de TAR, el aumento de los hallazgos por CE y los valores de I-FABP sugieren un mayor daño epitelial, el cual podría atribuirse al tratamiento y / o a la replicación viral *per se*. Intentar entender la fisiopatología del daño, abre vías para futuras investigaciones.

La realización del estudio de CE fue bien tolerado por los participantes. La ausencia de complicaciones y las nulas molestias que se presentaron en los pacientes demuestran que es una herramienta útil para seguimientos longitudinales de investigación, excepto por su costo elevado, el cual podría limitar su disponibilidad. Ninguno de los voluntarios que colaboraron en este proyecto refirió alguna queja o molestia, y se beneficiaron del

potencial de identificar otras patologías del tubo digestivo que de otra manera hubieran pasado desapercibidas.

Como perspectiva futura, sería interesante observar el comportamiento del intestino delgado en pacientes con VIH crónico con y sin TAR. Hipotéticamente, factores como el tiempo entre el inicio de la infección y el inicio del tratamiento, así como el tiempo de consumo ininterrumpido de TAR pudieran modificar los hallazgos. Completar un grupo control de pacientes sanos, podrá servir de comparativo en futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

- La mucosa del intestino delgado se observó sin cambios endoscópicos en sus tres porciones, en el 80% de las CE realizadas en pacientes con VIH reciente antes de iniciar TAR. En todos los casos, el íleon fue normal.
- Los hallazgos por CE aumentaron del primer al segundo estudio; esto podría atribuirse al tratamiento antirretroviral, y abre perspectivas para futuros trabajos.
- El comportamiento del I-FABP sugiere tener una relación positiva con el número de hallazgos por CE
- La CE es una herramienta útil para investigaciones longitudinales del intestino delgado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haberse realizado sin la ayuda y participación de muchas personas. Quizá este espacio es insuficiente para nombrarlas a todas, pero no quiero dejar pasar la oportunidad de intentar mencionar a quienes me acompañaron a lo largo de este proceso, y lo hicieron posible. Gracias:

- A los pacientes que confiaron y aceptaron participar.
- A mi familia: Manu, Camilo, Lala, Tototó
- A mi comité tutorial: La Dra. Sandra Pinto, el Dr. Gustavo Reyes Terán y el Dr. Gerardo Blanco V.
- A mis jefes: el Dr. Gustavo Reyes Terán (de nuevo), y el Dr. Santiago Ávila
- A mi mano derecha, la L. Enf. Esp Gabriela García; y a la izquierda, la L. Enf. Sonia Zacarías.
- A las Q.F.B. Monserrat Chávez y Nadia Montufar
- A los médicos pasantes que tuve el gusto de acompañar durante su servicio social: Raúl Pérez y Julio César Lara
- Al Dr. Akio Murakami por el seguimiento clínico de los participantes
- Al biólogo Gonzalo Salgado por la coordinación del protocolo C 71-18
- Al equipo de toma de muestra y laboratorio virológico del CIENI: Edna, Nahum, Ray, Ramón
- Al equipo de compras del CIENI: Chuy, Omar, Ofelia, Dan
- Al equipo de almacén e inventarios del CIENI: Diana, Karen, Iván, Caro
- A Manuel Becerril, nuestro puente con la Clínica Condesa
- A la Dra. Yara Luna por el acompañamiento de los pacientes
- Al equipo de trabajo social del CIENI: Graciela y Uriel
- A mis compañeros de maestría: Nancy, Jorge, Ángel, Mauricio
- A todos mis maestros de maestría y al coordinador de la sede del INER, el Dr. Pérez Padilla

BIBLIOGRAFÍA.

1. Volk N, Lacy B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2017;27(1):1-13. doi:10.1016/j.giec.2016.08.001
2. Potten CS, Gandara R, Mahida YR, Loeffler M, Wright NA. The stem cells of small intestinal crypts: where are they? *Cell Prolif.* 2009;42(6):731-750. doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00642.x
3. Cormack, D. Histología de HAM. 9na ed, Ed. Harla, 2000.
4. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* 2005;7(7-8):997-1004. doi:10.1016/j.micinf.2005.04.003
5. Vergnon-Miszczycha D, Lucht F, Roblin X, Pozzetto B, Paul S, Bourlet T. Infection par le virus de l'immunodéficience humaine: Rôle majeur du tissu lymphoïde de la muqueuse digestive (GALT). *Médecine/sciences.* 2015;31(12):1092-1101. doi:10.1051/medsci/20153112012
6. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-871. doi:10.1126/science.6189183
7. Coffin J, Haase A, Levy JA, et al. What to call the AIDS virus? *Nature.* 1986;321(6065):10-10. doi:10.1038/321010a0
8. Rosas Escareño AN, Hernández Madrigal PG, Nájjar Guerrero I, Guzmán Pérez CR, Castañeda Achitiguí FD. Características estructurales y funcionales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Enfermedades Infecc Microbiol.* 2013;33(4):163-173.
9. Codina C, Martín MT, Ibarra O. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. In: *Farmacia Hospitalaria.* pp. 1493-1516. http://www.sld.cu/galerias/pdf/servicios/sida/tomo2_cap21.pdf
10. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):749-759. doi:10.1084/jem.20040874
11. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med.* 2004;200(6):761-770. doi:10.1084/jem.20041196
12. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Secretaría de Salud, marzo 2020. Accessed October 4, 2021.

https://epidemiologia.salud.gob.mx/gobmx/salud/documentos/manuales/37_Manual_VIH-SIDA_2020.pdf

13. McGowan I, Elliott J, Fuerst M, et al. Increased HIV-1 Mucosal Replication Is Associated With Generalized Mucosal Cytokine Activation. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;37(2):1228-1236. doi:10.1097/01.qai.0000131846.12453.29
14. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365-1371. doi:10.1038/nm1511
15. Kotler DP. Enteropathy Associated with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann Intern Med*. 1984;101(4):421. doi:10.7326/0003-4819-101-4-421
16. Ives NJ, Gazzard BG, Easterbrook PJ. The Changing Pattern of AIDS-defining Illnesses with the Introduction of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) in a London Clinic. *J Infect*. 2001;42(2):134-139. doi:10.1053/jinf.2001.0810
17. Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA. Guía de manejo antirretroviral de las personas que viven con el VIH/SIDA. México. Secretaría de Salud; 2004.
18. Imahashi M, Ode H, Kobayashi A, et al. Impact of long-term antiretroviral therapy on gut and oral microbiotas in HIV-1-infected patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):960. doi:10.1038/s41598-020-80247-8
19. Clay PG, Crutchley RD. Noninfectious Diarrhea in HIV Seropositive Individuals: a Review of Prevalence Rates, Etiology, and Management in the Era of Combination Antiretroviral Therapy. *Infect Dis Ther*. 2014;3(2):103-122. doi:10.1007/s40121-014-0047-5
20. Braga Neto MB, Aguiar CV, Maciel JG, et al. Evaluation of HIV protease and nucleoside reverse transcriptase inhibitors on proliferation, necrosis, apoptosis in intestinal epithelial cells and electrolyte and water transport and epithelial barrier function in mice. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:90. doi:10.1186/1471-230X-10-90
21. Hill A, Balkin A. Risk factors for gastrointestinal adverse events in HIV treated and untreated patients. *AIDS Rev*. 2009;11(1):30-38.
22. Chun T, Nickle DC, Justement JS, et al. Persistence of HIV in Gut-Associated Lymphoid Tissue despite Long-Term Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*. 2008;197(5):714-720. doi:10.1086/527324
23. Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol*. 2008;1(1):23-30. doi:10.1038/mi.2007.1

24. Batman PA, Kapembwa MS, Belmonte L, et al. HIV enteropathy: HAART reduces HIV-induced stem cell hyperproliferation and crypt hypertrophy to normal in jejunal mucosa. *J Clin Pathol*. 2014;67(1):14-18. doi:10.1136/jclinpath-2012-201289
25. Real Academia Española: Diccionario de La Lengua Española. 23a. Versión 23.4 en línea. Accessed July 19, 2021. <https://dle.rae.es>
26. Khashab MA, Pasha SF, Muthusamy VR, et al. The role of deep enteroscopy in the management of small-bowel disorders. *Gastrointest Endosc*. 2015;82(4):600-607. doi:10.1016/j.gie.2015.06.046
27. Instituto Nacional del Cáncer. Diccionario de cáncer del NCI. In: Diccionario de Cáncer Del NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/enteroscopia-de-doble-balon>
28. Xin L, Liao Z, Jiang Y-P, Li Z-S. Indications, detectability, positive findings, total enteroscopy, and complications of diagnostic double-balloon endoscopy: a systematic review of data over the first decade of use. *Gastrointest Endosc*. 2011;74(3):563-570. doi:10.1016/j.gie.2011.03.1239
29. Wang A, Banerjee S, Barth BA, et al. Wireless capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc*. 2013;78(6):805-815. doi:10.1016/j.gie.2013.06.026
30. Oette M, Stelzer A, Göbels K, et al. Wireless capsule endoscopy for the detection of small bowel diseases in HIV-1-infected patients. *Eur J Med Res*. 2009;14(5):191. doi:10.1186/2047-783X-14-5-191
31. Höög CM, Bark L-Å, Arkani J, Gorsetman J, Broström O, Sjöqvist U. Capsule Retentions and Incomplete Capsule Endoscopy Examinations: An Analysis of 2300 Examinations. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:1-7. doi:10.1155/2012/518718
32. Sakai E, Higurashi T, Ohkubo H, et al. Investigation of Small Bowel Abnormalities in HIV-Infected Patients Using Capsule Endoscopy. *Gastroenterol Res Pract*. 2017;2017:1-7. doi:10.1155/2017/1932647
33. Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*. 2003;17(13):1871-1879.
34. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):11-23. doi:10.1038/nri2674
35. Delvaux M. Minimal Standard Terminology. *Endoscopy*. 2006;32(02):159-188. doi:10.1055/s-2006-925452

36. Pasha, S. Clinical review: How to recognize subtle lesions on capsule endoscopy. *ASGE Leading Edge*. 2015;5(3):1-11
37. Leenhardt R, Buisson A, Bourreille A, et al. Nomenclature and semantic descriptions of ulcerative and inflammatory lesions seen in Crohn's disease in small bowel capsule endoscopy: An international Delphi consensus statement. *United Eur Gastroenterol J*. 2020;8(1):99-107. doi:10.1177/2050640619895864
38. Albuquerque A. Nodular lymphoid hyperplasia in the gastrointestinal tract in adult patients: A review. *World J Gastrointest Endosc*. 2014;6(11):534-540. doi:10.4253/wjge.v6.i11.534
39. Levendoglu H, Rosen Y. Nodular lymphoid hyperplasia of gut in HIV infection. *Am J Gastroenterol*. 1992;87(9):1200-1202.
40. Hermans PE, Huizenga KA, Hoffman HN, Brown AL, Markowitz H. Dysgammaglobulinemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine. *Am J Med*. 1966;40(1):78-89. doi:10.1016/0002-9343(66)90189-6
41. Rubio-Tapia A, Hernández-Calleros J, Trinidad-Hernández S, Uscanga L. Clinical characteristics of a group of adults with nodular lymphoid hyperplasia: A single center experience. *World J Gastroenterol WJG*. 2006;12(12):1945-1948. doi:10.3748/wjg.v12.i12.1945
42. Kearney DJ, Steuerwald M, Koch J, Cello JP. A Prospective Study of Endoscopy in Hiv-Associated Diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(3):596-602. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.00920.x
43. Cello JP. Capsule endoscopy features of human immunodeficiency virus and geographical diseases. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2004;14(1):169-177. doi:10.1016/j.giec.2003.10.008
44. Funaoka H, Kanda T, Fujii H. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases. *Rinsho Byori*. 2010;58(2):162-168.
45. Funaoka H, Kanda T, Kajiura S, Ohkaru Y, Fujii H. Development of a high-specificity sandwich ELISA system for the quantification of human intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) concentrations. *Immunol Invest*. 2011;40(3):223-242. doi:10.3109/08820139.2010.534216
46. Chávez-Torres M. Relación entre la microbiota intestinal y el grado de reconstitución inmune durante el primer año de tratamiento antirretroviral en individuos infectados por VIH. [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional]. Published online 2020.
47. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, et al. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(12):2218-2224. doi:10.1002/ibd.22917
48. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295. doi:10.1101/cshperspect.a016295

ANEXOS

ANEXO 1. Antirretrovirales disponibles en México

Inhibidores Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INTR)				
ARV	Presentación	Posología	Número de tabletas/día	Categoría durante el embarazo**
Abacavir (ABC)	Tab 300 mg	300 mg c/12 h VO	2	C
Emtricitabina (FTC)	Cap 200 mg	200 mg c/24 h VO	1	B
Lamivudina (3TC)	Tab 150 mg	150 mg c/12 h VO	2	C
Tenofovir disoproxil fumarato (TDF)	Tab 300 mg	300 mg VO c/24 h	1	B
Tenofovir disoproxil succinato (TDS)	Tab 300 mg	300 mg VO c/24 h	1	B
Zidovudina (ZDV)*	Cap 100 y 250 mg	200 mg c/8 h VO o 250-300 mg c/12 h VO	2-6	C
Inhibidores No Nucleósidos de la Transcriptasa Reversa (INNTR)				
ARV	Presentación	Posología	Número de tabletas/día	Categoría durante el embarazo**
Doravirina (DOR)	Tab 100mg	100mg c/24hrs VO	1	No hay estudios
Efavirenz (EFV)	Tab 600 mg	600 mg c/24 h VO	1	D
Etravirina (ETV)	Tab 200 mg	200 mg c/12 h VO	4	B
Nevirapina (NVP)***	Tab 200 mg	200 mg c/12 h VO*	2	B
Inhibidores de la Proteasa (IP)				
ARV	Presentación	Posología	Número de tabletas****	Categoría durante el embarazo**
Atazanavir (ATV)	Cap 300 mg	300 mg + 100 mg de ritonavir c/24 h VO	1	B
Darunavir	Tab 400 y 600 mg	600 mg + 100 mg de ritonavir c/12 h VO	4	B
		800 mg + 100 mg de ritonavir c/24 h VO	3	
Etanolato de Darunavir	Tab 75, 150, 400 y 600 mg	600 mg + 100 mg de ritonavir c/12 h VO	4	B
		800 mg + 100 mg de ritonavir c/24 h VO	3	
Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)	Tab 200/50 mg	400 mg + 100 mg c/12 h VO	4	C

Ritonavir (RTV)	Tab 100 mg	Solo usado como refuerzo de otros IP a razón de 100 a 400 mg VO (dosis dependiente del IP que acompaña)	1-4	B
Saquinavir**** (SQV)	Tab 500 mg	1,000 mg + 100 mg ritonavir c/12 h VO	6	B
Inhibidores de la entrada				
T-20 Enfuvirtida	Amp 90 mg/ml	90 mg SC c/12 h	2	B
Maraviroc (MVC)	Tab 150 y 300 mg	<ul style="list-style-type: none"> • 300 mg VO c/12 h coadministrado con INTR, tipranavir/ritonavir, enfuvirtida o nevirapina; • 150 mg VO c/12 h coadministrado con inhibidores de proteasa (excepto tipranavir/r), ketoconazol, itraconazol, nefazadona, claritromicina y telitromicina. • 600 mg VO c/12 h en coadministración con efavirenz, etravirina, rifampicina, carbamacepina, fenitoína y fenobarbital. 	De acuerdo a dosis recomendada	B
Inhibidores de la integrasa				
ARV	Presentación	Posología	Número de aplicaciones*	Categoría durante el embarazo**
Dolutegravir (DTG)	Tab 50 mg	1 c/24 h VO	1	C
Raltegravir (RAL)	Tab 400 mg Tab 600 mg	1 c/12 h VO 1 c/24 h VO	2 1	C
Combinaciones tabletas únicas				
ZDV/3TC*	Tab 150 mg y Zidovudina 300 mg	300 mg/150 mg c/12 h VO	2	C
ABC/3TC	Tab abacavir 600 mg y lamivudina 300 mg	600/300 mg c/24 h VO	1	C
ABC/3TC/DTG	Tab abacavir 600 mg, lamivudina 300 mg y dolutegravir 50 mg	600/300/50 mg c/24 h VO	1	C
BIC/FTC/TAF	Tab bicitgravir 50mg, entricitabina 200, tenofovir alafenamida 25mg	50/200/25mg c/24hrs VO	1	C
DOR/3TC/TDx	Tab doravirina 100mg, lamivudina 300mg y tenofovir disoproxilo 300mg	100/300/300/mg c/24hrs VO	1	No hay estudios
Etalonato de Darunavir/c	Tab darunavir 800 mg y cobicistat 150 mg	800/150 mg c/24 h VO	1	B

TAF/FTC	Tab tenofovir alafenamida 10 mg y emtricitabina 200 mg	10/200 mg c/24 h VO	1	B
TAF/FTC	Tab tenofovir alafenamida 25 mg y emtricitabina 200 mg	25/ 200 mg c/ 24 h VO	1	B
TDF/FTC	Tab emtricitabina 200 mg y tenofovir disoproxil fumarato 300 mg	300/200 mg c/24 h VO	1	B
TDS/FTC	Tab tenofovir disoproxil succinato 300 mg y emtricitabina 200 mg	300/200 mg c/24 h	1	B
TDF/FTC/EFV	Tab emtricitabina 200 mg, tenofovir disoproxil fumarato 300 mg y efavirenz 600 mg	300/200/600 mg c/24 h VO	1	D
TDF/3TC/EFV	Tab lamivudina 300 mg, tenofovir disoproxil fumarato 300 mg y efavirenz 600 mg	300/300/600 mg c/24 h VO	1	D

*Disponibles como genérico intercambiable u otra marca.

** Categoría de uso de drogas durante el embarazo: A. Estudios adecuados, bien controlados en embarazadas no han mostrado un incremento en el riesgo de anomalías fetales; B. Estudios en animales no han revelado evidencia de daño fetal, sin embargo, no existen estudios adecuados o bien controlados en embarazadas, o los estudios en animales han demostrado algún efecto adverso, pero estudios adecuados y bien controlados en embarazadas han fracasado en demostrar dicho riesgo; C. Estudios en animales han demostrado algún efectos adverso y no existen estudios adecuados, bien controlados en embarazadas, o no se han realizado estudios bien controlados en embarazadas ni en animales; D. Existe evidencia de estudios bien controlados u observaciones en embarazadas de riesgo fetal. Sin embargo, los beneficios de la terapia pudieran superar al riesgo potencial; y X. Existe evidencia de estudios bien controlados u observaciones en animales o embarazadas de anomalías fetales. El uso del producto se encuentra CONTRA-INDICADO en mujeres que están o pudieran estar embarazadas.

***Requiere posología de inicio de 200 mg/d 15 días, posteriormente dosis citada.

**** El número de tabletas hace referencia al total incluyendo Ritonavir.

Tomado de Secretaría de Salud, 2021¹⁷

ANEXO 2. Revisión de seguridad para el uso de cápsula endoscópica en investigación

La siguiente información forma parte de las consideraciones éticas y de seguridad presentadas al Comité de Investigación y Ética del INER para la aprobación del protocolo C 71-18

CÁPSULA ENDOSCÓPICA.

La cápsula endoscópica permite visualizar el tracto gastrointestinal al transmitir imágenes inalámbricas desde una cápsula desechable a un procesador de datos. El primer modelo para el intestino delgado fue aprobado por la FDA en el 2001, y desde entonces, esta tecnología ha mejorado su resolución, el tiempo de vida de la batería y la capacidad para observar diferentes áreas del tracto digestivo.

El sistema está integrado por tres partes: la cápsula desechable endoscópica; un sistema con parches que se adhieren al paciente, un cinturón con el grabador de datos y la batería; y una computadora personal con el software para la revisión e interpretación de las imágenes.

Se trata de un estudio relativamente simple para el paciente, quien sólo debe de tragar la cápsula. Una vez que la cápsula se deglute puede continuar con sus actividades cotidianas. La vía oral se retoma de 2 a 4 horas después de tomada la cápsula. Generalmente se le pide al paciente que vigile la salida de la cápsula en sus evacuaciones. Aproximadamente, en el 75% de los casos se logra visualizar el intestino delgado completo con 8 horas de batería. Algunos sistemas ofrecen baterías más largas para asegurar el 100% de visualización.

Este estudio se realizará en personas con infección aguda de VIH, o personas estables o sanas que tengan indicación para realizar cápsula endoscópica. En estos casos, se emplearán las imágenes del estudio para observar y caracterizar macroscópicamente la mucosa del intestino delgado en diferentes etapas de la enfermedad.

La cápsula endoscópica ha sido aprobada para varias indicaciones, incluso en pacientes tan jóvenes como de dos años de edad. Las aplicaciones aceptadas son: para la evaluación del Sangrado Gastrointestinal oscuro (oculto o evidente); en anemia por deficiencia de hierro; en sospecha de enfermedad de Crohn; para vigilancia de pacientes con síndromes polipósicos; en sospecha de tumores del intestino delgado; en sospecha de síndromes malabsortivos (como enfermedad celiaca); en el estudio de diarrea crónica y de enteropatía por AINES e hipertensiva portal; dolor crónico abdominal en estudio.

Adicionalmente, se solicitará la realización de cápsula endoscópica a donadores sanos y personas con la infección por VIH estables (e.g. sin infecciones oportunistas, con tratamiento antirretroviral). Si bien, estas personas no requieren el procedimiento con fines terapéuticos o diagnósticos, se solicitará la muestra para cumplir los objetivos del protocolo de investigación. Como se describe a continuación el riesgo del procedimiento es mínimo.

ANÁLISIS DE RIESGO

A continuación, se presenta una revisión bibliográfica en donde se evidencia la seguridad del procedimiento para la obtención de biopsias del tubo digestivo alto.

En general la Cápsula Endoscópica Inalámbrica (CEI) es un procedimiento seguro. Su efecto adverso potencial más importante es la retención de la cápsula, es decir, que no se excrete en la materia fecal. Una "cápsula endoscópica retenida" se define en la literatura como "aquella que permanece en el tracto digestivo un mínimo de dos semanas o aquella que ha requerido de terapia dirigida para lograr su tránsito". La retención puede ocurrir cuando hay estenosis de cualquier etiología (como AINES, enfermedad de Crohn, tumores del intestino delgado, enteritis por radiación, y estenosis anastomóticas quirúrgicas). De manera ocasional, también se han reportado retenciones en otros sitios como divertículos de Zenker, divertículos duodenales, hernia umbilical, divertículos de Meckel.

Technology Status Evaluation Report. Wireless capsule endoscopy. Gastrointestinal Endoscopy, Vol 78, No 6: 2013

Cave D, Legnani P, de Franchis R, et al. ICCE consensus for capsule retention. Endoscopy 2005;37:1065-7

La tasa de retención de la CEI se estima entre 1.3 y 1.4%. Se han reportado un par de casos de perforación intestinal después de una CEI, ambos casos en Enfermedad de Crohn y un caso de aspiración traqueal de la cápsula.

Hoog CM, Bark LA, Arkani J, et al. Capsule retentions and incomplete capsule endoscopy examinations: an analysis of 2300 examinations. Gastroenterol Res Pract 2012;518718. Liao Z, Gao R, Xu C, et al. Indications and detection,

completion, and retention rates of small-bowel capsule endoscopy: a systematic review. *Gastrointest Endosc* 2010;71:280-6

Gonzalez Carro P, Picazo Yuste J, Fernandez Diez S, et al. Intestinal perforation due to retained wireless capsule endoscope. *Endoscopy* 2005;37:684.

Yitzhak A, Bayme M, Perry ZH, et al. Small bowel perforation after capsule endoscopy in a patient with occult gastrointestinal bleeding and undiagnosed Crohn's disease. *Am Surg* 2012;78: E159-61.

Tabib S, Fuller C, Daniels J, et al. Asymptomatic aspiration of a capsule endoscope. *Gastrointest Endosc* 2004;60:845-8.

Bandorski D, Keuchel M, Bruck M, et al. Capsule endoscopy in patients with cardiac pacemakers, implantable cardioverter defibrillators, and left heart devices: a review of the current literature. *Diagn Ther Endosc* 2011:376053

Pacientes con cualquier patología que condicione estenosis del tubo digestivo (mencionadas previamente), fístulas, antecedentes quirúrgicos del abdomen, con antecedente conocido de divertículos, con antecedente de retención gástrica en una CEI previa, con alteraciones de la deglución, embarazadas y portadores de marcapasos serán excluidos de este estudio.

Aquellos pacientes con factores de riesgo para dismotilidad o tránsito intestinal lento tampoco serán candidatos a participar en este protocolo. Esta no es una contraindicación absoluta a la CE pero en ocasiones requiere que se coloque por medio de otros instrumentos en el intestino delgado; por lo que, paciente diabéticos o con ingesta de opioides serán excluidos.

A continuación, se enlistan diversas publicaciones que documentan la seguridad de la CE:

1. Höög C et al, Capsule Retentions and Incomplete Capsule Endoscopy Examinations: An Analysis of 2300 Examinations. *Gastroenterology Research and Practice*, Volume 2012 <http://dx.doi.org/10.1155/2012/518718>

En este estudio se incluyeron 2300 CEI realizadas en cuatro hospitales de Estocolmo. La retención de la CEI ocurrió en **31 pacientes (1.3%)** Los factores de riesgo para retención fueron enfermedad de Crohn conocida y sospecha de tumor. Las complicaciones de la retención de CEI fueron síntomas de obstrucción en 6 pacientes y una muerte relacionada con complicaciones posteriores a la cirugía para la extracción. En 27 pacientes, la CEI se retiró por cirugía y en un paciente por enteroscopia de doble balón. Dos pacientes se mantuvieron en observación durante dos años. En un caso pasó espontáneamente después de 2.5 años de conducta expectante.

2. Liao et al. Indications and detection, completion, and retention rates of small-bowel capsule endoscopy: a systematic review. *Gastrointest Endosc*. 2010 Feb;71(2):280-6. doi: 10.1016/j.gie.2009.09.031.

Se incluyeron 277 artículos en inglés, que en total registraron 22,840 procedimientos. La tasa de retención global de CEI fue de **1.4%**. Cuando la indicación fue Sangrado de Tubo Digestivo Oculto de 1.2%, cuando la indicación fueron síntomas clínicos reportados 2.6% y en sospecha de Enfermedad de Crohn 2.1%

3. Ormeci AC et al. Retention during capsule endoscopy: Is it a real problem in routine practice? *J Int Med Res*. 2016 Aug;44(4):968-75. doi: 10.1177/0300060516645420. Epub 2016 Jul 4.

Este estudio evalúa el riesgo y el pronóstico de la retención de la CEI. A todos los pacientes incluidos se les realizó una tomografía computada para evaluar por bloques el tracto gastrointestinal. En 359 sujetos, la tasa de retención fue de 3%, y se debió a lesiones malignas, a úlceras en el intestino delgado y a dismotilidad del esófago o estómago. Ninguno de los pacientes presentó síntomas de obstrucción u oclusión, ni ameritó tratamiento quirúrgico. Ellos concluyen que, realizar tomografía computada no es útil para predecir la retención de la CEI; pero la retención de la CEI ocurre siempre como resultado de la enfermedad subyacente.

Obtención de imágenes por CEI en pacientes sanos.

Como parte del análisis de riesgo se realizó la revisión bibliográfica de artículos científicos en donde se obtuvo la donación de imágenes mediante CEI en pacientes sanos, con el fin de realizar estudios de casos y controles. Los artículos mencionados utilizan dispositivos de tamaño muy parecido a la CEI y con características similares lo cual los hace completamente comparables.

En todos los estudios citados a continuación, el Comité de Ética local evaluó y aprobó el procedimiento de uso de una cápsula en donadores sanos con fines de investigación.

1. SmartPill® as an objective parameter for determination of severity and duration of postoperative ileus: study protocol of a prospective, two-arm, open-label trial (the PIDuSA study) [Dig Dis Sci](#). 2016 Jun 24. [Epub ahead of print]

La SmartPill es una cápsula que mide el valor del pH, la temperatura y la presión intraluminal del tracto digestivo y permite analizar del tránsito intestinal y la actividad del músculo liso in vivo. El objetivo primario de este estudio fue investigar la seguridad de la SmartPill después de una cirugía y documentar efectos adversos serios. Esta es una prueba prospectiva, de dos brazos; en el que a 55 pacientes post operados de cirugía de abdomen y con alto riesgo de presentar íleo postoperatorio se les dio la cápsula, y a 10 pacientes con cirugía extraabdominal que raramente presentarían íleo postoperatorio también. El protocolo fue aprobado por la autoridad federal (94.1.05-5660- 8976) y el comité local de ética. (092/14-MPG). Se realizó de acuerdo a los principios de

ICH-GCP (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Guideline for Good Clinical Practice) y la Declaración de Helsinki. Fue realizado en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Bonn. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. No se reportaron complicaciones.

2. Schostek S et al. Volunteer Case Series of a New Telemetric Sensor for Blood Detection in the Upper Gastrointestinal Tract: The HemoPill.

La cápsula HemoPill es ingerida por el paciente cuando se sospecha sangrado de tubo digestivo. Sus dimensiones y características son muy similares a las de la CEI. En este estudio, personas voluntarias ingirieron comida con o sin su propia sangre, un total de ocho veces, y posteriormente ingirieron la cápsula con sensor. Un procesador de datos espectrométrico recibió la información y los datos se analizaron por el sistema para determinar si había o no sangre en el estómago. La cápsula fue una herramienta útil para detectar la presencia del sangrado de tubo digestivo alto sin la necesidad de endoscopias. No hubo complicaciones.

3. Oette M et al. Wireless capsule endoscopy for the detection of small bowel diseases in HIV-1 infected patients. [Eur J Med Res](#). 2009; 14(5): 191–194. [10.1186/2047-783X-14-5-191](#).

Se incluyeron 49 pacientes divididos en tres grupos. Grupo A (n = 19): HIV+ CD4 < 200/μl, con síntomas gastrointestinales. Grupo B (n=19): HIV+, CD4 < 200/μl, sin síntomas gastrointestinales. Grupo C (n = 11) voluntarios sanos. El procedimiento fue bien tolerado y todas las cápsulas se recuperaron en las heces hasta 96 horas después, sin presentar complicaciones. El estudio fue aprobado por el comité de Ética local y todos los participantes firmaron consentimiento informado.

Resultados del Análisis de Riesgo

Con base en las publicaciones consultadas se confirma que la obtención de imágenes por medio de la Cápsula Endoscópica Inalámbrica es un procedimiento seguro y se ha realizado sin complicaciones en estudios previos.

La CEI es un estudio ampliamente aceptado, seguro, simple, no invasivo y bien tolerado por los pacientes, no requiere sedación, cirugía o exposición innecesaria a rayos x. El evento adverso más importante es la retención de la cápsula, que se presenta en el 1.3% de los casos, y siempre en relación a la patología subyacente del intestino delgado. En sujetos sin patología del tubo digestivo ésta potencial complicación es teóricamente inexistente.

A pesar de la importancia ya descrita del GALT en la evolución de la infección por VIH, solo encontramos una publicación respecto a las características macroscópicas del intestino delgado en pacientes con el virus y en población sana.

Consideraciones éticas para el reclutamiento de donadores sanos y personas con infección por VIH estables para la donación de GALT.

Con base en el análisis de riesgo, a continuación, se detallan el procedimiento para el reclutamiento de donadores de Tejido Linfoide asociado a Intestino. Aunque los efectos adversos son raros, el procedimiento está diseñado para disminuir el riesgo de los donadores al máximo posible.

1. Valoración inicial por el Médico Especialista en Endoscopia

Esta visita tiene como objetivo evaluar el estado general de salud del donador e identificar criterios de exclusión:

- Cualquier condición que en la opinión del Médico Especialista en Endoscopia pudiera ser una contraindicación para una endoscopia y/o que incremente el riesgo de la cápsula endoscópica. Estas condiciones incluyen, pero no se limitan a las siguientes:
- Estenosis de cualquier etiología (como AINES, enfermedad de Crohn, tumores del intestino delgado, enteritis por radiación, y estenosis anastomóticas quirúrgicas).
- Divertículos de Zenker, divertículos duodenales, hernia umbilical, divertículos de Meckel.
- Edad mayor a 65 años o menor de 18 años
 - Uso de anticoagulantes y antiplaquetarios, con énfasis en el uso de aspirina, warfarina, clopidogrel, heparina y la imposibilidad de suspender temporalmente el medicamento para realizar la endoscopia
 - Enfermedades hematológicas conocidas
 - Enfermedad hepática, pulmonar, cardíaca, renal o metabólica severas o descompensadas.
 - Embarazo
 - Abuso de drogas o alcohol
 - Complicaciones serias (como perforación) en una endoscopia previa
 - Plaquetas menores a 100,000
 - INR mayor de 1.3
 - Antecedente de retención gástrica en una CEI previa
 - Alteraciones de la deglución,
 - Portadores de marcapasos.
 - Aquellos pacientes con factores de riesgo para dismotilidad o tránsito intestinal lento tampoco serán candidatos a participar en este protocolo

a) Descripción de la consulta

Si el paciente cumple con los criterios de inclusión se le invitará a participar en el protocolo y se le explicará los detalles del procedimiento, riesgos y beneficios.

b) Explicación del procedimiento, riesgos y beneficios.

A continuación, se detallan los puntos que serán explicados verbalmente al paciente, los cuales también están incluidos en la carta de consentimiento.

- Usted es invitado a donar imágenes de la mucosa de su intestino y una muestra de sangre como parte de un estudio que tiene como objetivo evaluar el efecto de la infección por VIH sobre este tejido.
- La participación en el protocolo de investigación es completamente voluntaria. La atención médica que recibe no se verá afectada si usted decide que no participará en el protocolo
- Usted no recibirá compensación económica por la donación de la mucosa de su intestino.
- Un posible beneficio del estudio es el escrutinio de pólipos, cáncer, u otra anomalía detectada incidentalmente durante la cápsula endoscópica.
- El procedimiento de Cápsula Endoscópica Inalámbrica es un procedimiento seguro que tiene como objetivo obtener imágenes de su intestino delgado para realizar estudios de investigación.
- La mucosa del intestino es un tejido con diversas células de defensas (llamadas también células blancas o células del sistema inmunológico), las cuales han demostrado ser un sitio favorito para el inicio de la infección aguda por VIH, así como un sitio de resguardo o reservorio.
- El VIH es un virus que afecta a las células del sistema inmunológico, es decir las células de las defensas. El VIH infecta principalmente un tipo células de las defensas: los linfocitos T CD4+. Los niveles de linfocitos T CD4+ disminuyen con el avance de la enfermedad causada por el VIH. Las personas con niveles bajos de linfocitos T CD4+ tienen dificultades para controlar enfermedades oportunistas que pueden poner en riesgo su vida. Los linfocitos T CD4+ se encuentran en diversos tejidos, incluyendo la mucosa del intestino. Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto del VIH sobre los linfocitos T CD4+ de la mucosa del intestino. Este estudio evaluará la participación de estos sitios del intestino en el avance de la enfermedad causada por el VIH.
- El VIH es una enfermedad para la que hasta el momento no existe una cura. Una de las principales causas por las cuales no es posible erradicar la infección por VIH es la existencia de los reservorios del virus. Los reservorios de VIH son células que contienen el virus, las cuales no pueden ser eliminadas por las células de las defensas ni por el tratamiento antirretroviral. Estas células pueden permanecer en los tejidos por años en un estado de reposo. Uno de los tejidos en los que se ha observado que se guardan estas células es el tejido linfóide del intestino. Se ha observado que, en este sitio, se permite la sobrevivencia continua de células en reposo. Por

esta razón, es necesario estudiar el comportamiento de los linfocitos T CD4+ en el tejido linfoide del intestino delgado.

- El procedimiento de la Cápsula Endoscópica Inalámbrica es seguro. Aunque existen efectos adversos relacionados con el procedimiento, solo se observan en el 1.3% de todos los casos. El efecto adverso más importante es la retención de la cápsula. Esto se ha observado principalmente, en pacientes con estenosis (estrechamiento) del tubo digestivo, Enfermedad de Crohn y tumores conocidos, por lo que, si usted ha tenido el diagnóstico de alguno de estos, debe de decírselo a su investigador responsable.
- El médico especialista en endoscopia realizará una evaluación clínica para determinar que no existan otras contraindicaciones para su estudio. Adicionalmente es necesario realizar exámenes de sangre (biometría hemática, tiempos de coagulación) para determinar que su estado de salud es indicado para realizar el procedimiento. Los médicos revisarán los resultados de los exámenes y le harán saber si usted puede participar en el estudio.
- El procedimiento para obtener las “fotos” de su intestino es ambulatorio. Es decir, no es necesaria la internación en un hospital o una clínica.
- El procedimiento será realizado por un médico especialista en Endoscopia, quien ha sido certificado para realizar el procedimiento.
- La Cápsula Endoscópica Inalámbrica es una cápsula de 2.5cm aproximadamente, la cual al ser ingerida toma imágenes del tubo digestivo. Estas imágenes se guardan de forma inalámbrica en un procesador que usted llevará colgado a su cuerpo. Para que esto sea posible, se le colocarán unos parches en la piel que transmitirán la señal de la cápsula al procesador.
- Este estudio no genera dolor ni molestias, excepto la deglución de la cápsula.
- Para realizar el estudio deberá tener una preparación especial, que consiste en tomar dos litros de un laxante un día previo al estudio; tomar solo líquidos 12 horas antes del estudio y permanecer en ayuno de 6 horas antes del estudio.
- Una vez ingerida la cápsula podrá tomar líquidos claros a las 2 horas y una comida ligera a las 4 horas. Se le solicitará no realizar ejercicio o actividades que pudieran despegar los parches de su piel durante el estudio.
- Mientras dure el estudio no podrá realizarse Resonancias Magnéticas.
- Una vez que se termine la batería de la cápsula (entre 8 y 12 horas), los parches y el procesador serán retirados. La cápsula es desechable y saldrá excretada en sus heces, esto puede demorar hasta 96 horas.
- En muy raras ocasiones la cápsula puede no salir en las evacuaciones, en este caso, usted será vigilado estrechamente con revisiones clínicas y radiografías de abdomen, en las que es muy fácil identificar la cápsula. Si no presenta ninguna molestia su seguimiento será médico. Sólo en caso de presentar dolor muy intenso, vómito, o incapacidad para evacuar podría requerir tratamiento quirúrgico.
- Si usted presenta complicaciones relacionadas con el procedimiento, el CIENI del INER proveerá la atención médica correspondiente de manera gratuita. Usted podrá acudir al CIENI del INER en caso de complicaciones.

Si el paciente bajo su propia voluntad decide realizarse la Cápsula Endoscópica Inalámbrica, se le solicitará firmar la carta de consentimiento.

ANEXO 3. Oficios de aprobación del protocolo por el Comité de Ética e Investigación

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INER INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

Comité de Investigación
15 CI 09 012 020

Ciudad de México a 22 de Noviembre de 2018
INER/CI/403/18

Dr. Gustavo Reyes Terán
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN.
APROBACIÓN

Título del Proyecto: COHORTE DE INVESTIGACIÓN LONGITUDINAL PARA EL ESTUDIO DEL VIH/SIDA EN MÉXICO.

Código asignado por el Comité: **C71-18**

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	No. y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de Amígdalas y Adenoides	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras provenientes de autopsias	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de imágenes obtenidas por cápsula endoscópica	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras obtenidas por citología cérvico-vaginal y/o anal	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de tejido intestinal obtenido por colonoscopia	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de ganglios linfáticos	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras de heces fecales	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras obtenidas por leucoféresis	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras sanguíneas a través de seguimiento longitudinal	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO

Pág. 1 de 3

Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras de médula ósea y biopsia de hueso	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras otorrinolaringológicas	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de tejido intestinal obtenido por panendoscopia	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras de piel	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de sangre, muestreo transversal	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento informado para realizar la prueba de detección del VIH	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras remanentes de procedimientos clínicamente indicados	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras de personas que reciben tratamientos potenciales contra el VIH	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de Amígdalas y Adenoides	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras provenientes de autopsias	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de imágenes obtenidas por cápsula endoscópica	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras obtenidas por citología cérvico-vaginal y/o anal	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de tejido intestinal obtenido por colonoscopia	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de ganglios linfáticos	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras de heces fecales	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras obtenidas por leucoféresis	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras de médula ósea y biopsia de hueso	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras otorrinolaringológicas	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de tejido intestinal obtenido por panendoscopia	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras de piel	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado personas con VIH - Donación de muestras remanentes de procedimientos clínicamente indicados	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO

Consentimiento Informado grupo control - Donación de sangre, muestreo transversal	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Consentimiento Informado grupo control - Donación de muestras de personas que reciben tratamientos potenciales contra el VIH	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO
Cuestionario de salud audio vestibular	Versión 1, Noviembre 2018	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de noviembre 2018 a noviembre 2028.

La hoja de costos tiene vigencia al 31 de diciembre, por lo que Usted deberá solicitar su actualización y presentar una copia al Comité en enero de cada año.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente



Dra. en C. Blanca Margarita Bazán Perkins
Presidente del Comité

ANEXO 4. Consentimiento Informado para participantes VIH positivos aprobado por el Comité de Ética e Investigación



Cohorte de Investigación Longitudinal
para el Estudio del VIH/SIDA en México
DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA



Título del protocolo: Cohorte de Investigación Longitudinal para el Estudio del VIH/SIDA en México.

Patrocinador: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Sitio de Investigación: Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI).

Investigador Principal y Responsable Científico: Dr. Santiago Ávila Ríos, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Dirección: Calzada de Tlalpan #4502, Col. Sección XVI CP 14080, Ciudad de México, México.
Teléfonos: 5171-4697 o 5171-4718

Correo electrónico: santiago.avila@cieni.org.mx

Esta es una invitación para que usted participe voluntariamente en una investigación, mediante la donación de sangre y de imágenes obtenidas por cápsula endoscópica.

El Dr. Santiago Ávila Ríos, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), conduce una investigación para saber qué elementos determinan, en una persona con VIH, el control de la replicación del virus antes y después del tratamiento antirretroviral (TAR). Además, pretende identificar las causas de la permanencia de VIH en tejidos del organismo humano, que obstaculizan su eliminación aun con un tratamiento antirretroviral eficaz.

El estudio se realizará con el apoyo económico del gobierno federal mexicano. Los comités de investigación y el de ética en investigación del INER evaluaron y aprobaron esta investigación.

En México y en otras partes del mundo, las instituciones reguladoras de la salud requieren que usted esté completamente informado de la naturaleza, objetivos y riesgos de cada uno de los diferentes procedimientos que se harán para realizar este estudio. Si el documento contiene palabras desconocidas o frases que no comprenda bien, por favor tenga libertad de preguntar al médico, o al personal con quien discute este documento, para resolver todas sus dudas. Usted debe recibir una copia de este documento, llamado carta de consentimiento informado.

Usted deberá llevarse la carta de consentimiento informado a su casa, para que tome la decisión de participar o no en la investigación a la que se le invita, una vez que haya tenido la asesoría que usted considere, contando con el tiempo que requiera.

Antes de que usted firme esta carta de consentimiento le preguntaremos si ha leído y comprendido su contenido, especialmente los riesgos o beneficios potenciales que pueden resultar de su participación en esta investigación. Si usted lo desea, puede pedir una copia del proyecto de investigación completo, es decir el documento que describe con detalle las razones por las que se realiza este estudio, sus alcances y todos los procedimientos que se harán con las muestras que usted donará voluntariamente para la investigación.

RESUMEN DEL PROYECTO: Importancia y objetivos del estudio.

Se sabe ahora que el tratamiento antirretroviral (TAR) controla muy bien al VIH y con ello detiene el avance de la enfermedad. Esto hace de la infección por VIH una enfermedad crónica, controlable, que por un tiempo largo no pone en riesgo la vida de las personas infectadas siempre y cuando reciban el tratamiento y vigilancia adecuados.

Sin embargo, el TAR tiene algunas limitantes enlistadas a continuación:

El TAR no puede eliminar al VIH del cuerpo de las personas infectadas.

Se ha demostrado que el VIH evita su eliminación porque se esconde dentro de células que impiden el efecto tratamiento antirretroviral. Estas células son auténticos reservorios o escondites del virus. Los reservorios se localizan en varios tejidos: los tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, amígdalas, adenoides), el intestino, la médula ósea y probablemente también en otros tejidos no bien identificados. El tamaño del reservorio en esos tejidos es mucho mayor que en la sangre y ese tamaño se mantiene estable en las personas con VIH tratadas por más de 10 años, aunque tengan la carga viral indetectable. Por tanto, es fundamental estudiar por qué y cómo se forma el reservorio de VIH, definir bien cómo funciona, qué lo mantiene y por qué permanece estable tanto tiempo. Descubrir las respuestas a estas interrogantes, ayudará a proponer y desarrollar nuevas estrategias para erradicar ese escondite del VIH que impide la curación de la infección.

Las defensas del cuerpo, destruidas por el VIH, no se recuperan por completo.

El VIH destruye directa e indirectamente al sistema inmunitario (un sistema de defensas que tiene el cuerpo humano contra las infecciones). El tratamiento antirretroviral, por tanto, al controlar la replicación del virus produce la recuperación del sistema inmunitario. Sin embargo, la recuperación es solamente parcial en la mayoría de los pacientes. Solo los que inician el tratamiento antirretroviral muy tempranamente después de la infección, tienen las mayores oportunidades de recuperar casi totalmente el sistema de defensas. Lamentablemente la detección de personas con VIH en México ocurre en general muy tardíamente, cuando han pasado varios años de la infección y el virus ha destruido considerablemente el sistema inmunitario de las personas infectadas. Más aún, la disfunción inmunitaria se ha observado principalmente en estudios realizados en la sangre periférica de las personas con VIH y no en los tejidos linfoides, donde el virus se concentra y están distribuidos en todo el cuerpo humano, especialmente en el intestino, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Para poder buscar estrategias que restauren totalmente la función del sistema inmunitario de la persona infectada, es necesario determinar con precisión las alteraciones que se producen en los tejidos linfoides, donde se genera la respuesta inmune y no solamente en la sangre periférica.

Importancia de la investigación científica en el CIENI

El CIENI del INER cuenta con la infraestructura humana multidisciplinaria conformada por clínicos e investigadores, infraestructura física constituida por laboratorios y equipos de investigación y colaboraciones internacionales (reconocido grupo de científicos en varias partes del mundo) para contribuir a responder las interrogantes descritas y ayudar en la búsqueda de nuevas estrategias que controlen mejor al VIH, siempre y cuando podamos contar con su participación voluntaria.

El CIENI del INER puede contribuir a entender mejor los fenómenos descritos antes solo si usted y otras personas participan donando sangre e imágenes de cápsula endoscópica.



¿Qué es el intestino?

El intestino es la porción del sistema digestivo que se encuentra entre el estómago y el ano. El intestino se divide en dos segmentos: el intestino grueso y el intestino delgado (Ver [Figura 1](#)). Su principal función es extraer los nutrientes de los alimentos. Sin embargo, el intestino también juega un papel importante en el control de bacterias, virus y parásitos que pueden ser ingeridos en los alimentos. Por esta razón, el intestino contiene una gran cantidad de células del sistema inmunitario (el sistema de defensas del cuerpo cuya función es el control de enfermedades). Entre estas células se encuentran los linfocitos T CD4+, que son las células que infecta el VIH.

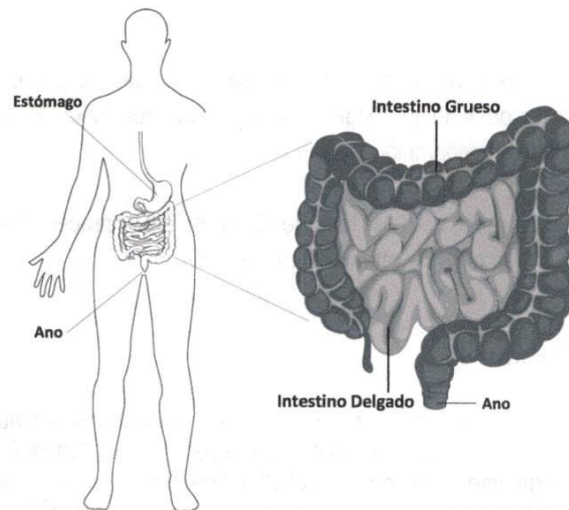


Figura 1. Intestino Grueso e Intestino Delgado

Imágenes modificadas de <https://catalog.niddk.nih.gov> y <http://wholelifebalance.com/>



¿Por qué es importante estudiar el tejido intestinal en la infección por VIH?

El intestino es el tejido que tiene la mayor cantidad de linfocitos T CD4+. Se estima que el intestino contiene entre el 60% y 80% de los linfocitos T CD4+ de todo el cuerpo. En comparación, la sangre solamente contiene entre el 1% y el 3%. Diversas investigaciones han demostrado que una porción de las células infectadas por el VIH, los linfocitos T CD4+, se encuentran de manera preferencial en el intestino. Los reservorios de VIH podrían sobrevivir por meses, incluso años en estos sitios. Las investigaciones del CIENI ayudarán a entender las razones por las que el virus prefiere esconderse en este tejido y podrían ayudar a diseñar nuevas estrategias de tratamiento contra el VIH en el futuro.

Objetivo General de la investigación:

Estudiar los factores virológicos, inmunológicos, anatómicos, celulares, moleculares y genéticos relacionados con:

- La permanencia del virus en el cuerpo humano a pesar del tratamiento antirretroviral eficaz
- La evolución de la enfermedad por VIH en la población mexicana.
- Los efectos del tratamiento antirretroviral a largo plazo.

Objetivos Particulares de la Donación de imágenes de intestino:

- Describir los cambios presentes en la mucosa del tubo digestivo secundarios a la infección por VIH en diferentes etapas de la enfermedad.

Procedimientos, Riesgos y Molestias.

Para donar imágenes del intestino es necesario que usted realice tres visitas al CIENI:

- Primera Visita

Durante la primera visita, los médicos del CIENI determinarán si su estado de salud es adecuado para realizar un estudio de cápsula endoscópica. Por esta razón, le realizarán estudios de sangre y una valoración médica detallada, la cual puede incluir un interrogatorio y exploración física. Es necesario que se presente en ayuno de al menos 8 horas.

- Segunda Visita

Durante la segunda visita se tomará otra muestra de sangre, se le entregará un procesador de imágenes que llevará en un cinturón durante el tiempo del estudio e ingerirá la cápsula endoscópica. Es necesario que se presente en ayuno de al menos 8 horas y previa preparación intestinal.

- Tercera visita.

Será el mismo día de la segunda visita, pero por la tarde. Se le retirará el procesador de imágenes y será valorado por el personal médico del CIENI en caso de referir alguna molestia.

Donación de una muestra de sangre:

Para llevar a cabo esta investigación, necesitamos trabajar en nuestros laboratorios una muestra de sangre. Para obtener la muestra de su sangre, con material desechable se punciona una vena del antebrazo. El procedimiento es seguro si lo realiza el personal capacitado y experimentado como el del CIENI del INER. La extracción de sangre produce dolor y molestias en el sitio de punción con la aguja, que son pasajeras. En ocasiones, se forman moretones en la piel, por pequeños derrames de sangre, que generalmente desaparecen en una o dos semanas. Excepcionalmente hay infección del sitio de la punción. Si esto ocurriera, la infección será tratada por el personal médico del CIENI sin costo para usted. Se obtendrá un máximo de 95 mililitros de sangre (unas 9 cucharadas soperas) en cada una sus visitas calendarizadas para este protocolo. Aunque esta cantidad podría parecerle excesiva, sobre todo por el número de tubos que se utiliza, usted debe saber que no tiene ningún efecto sobre su estado de salud. Las muestras de sangre y sus componentes se almacenarán por tiempo indefinido en el CIENI para realizar, solo si usted lo autoriza, procedimientos de investigación en el futuro.

Imágenes de intestino obtenidas por cápsula endoscópica:

La cápsula endoscópica consiste en una video cámara del tamaño de una cápsula, la cual debe de ser ingerida con un vaso de agua. Mide 2.5cm aproximadamente, tiene su propia fuente de luz y toma fotografías durante su trayecto a través del intestino. Las fotos que obtienen, se mandan a un procesador de imágenes que usted llevará en un cinturón cerca del cuerpo y en algunos casos conectado a unos sensores en la piel del abdomen. Una vez terminado el estudio, el doctor podrá ver estas imágenes en una computadora.

La cápsula endoscópica un estudio específico para revisar el intestino delgado, el cual no puede verse ni por panendoscopia ni colonoscopia. (Ver [Figura 2](#)).



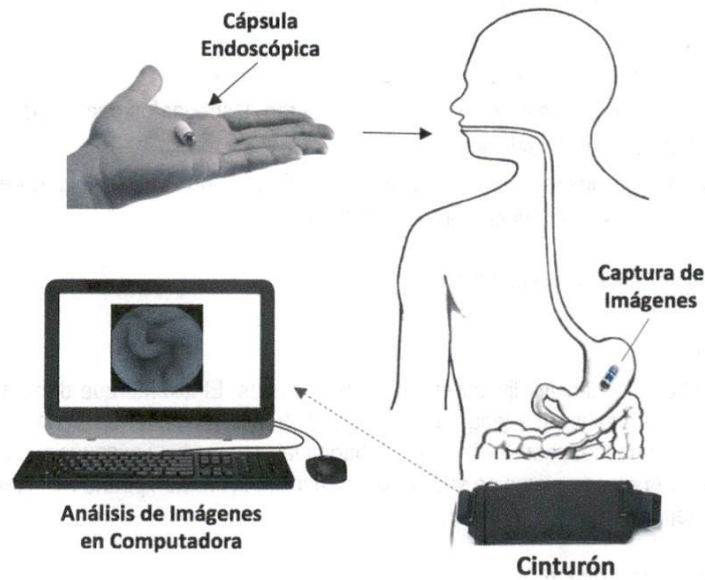


Figura 2. Procedimiento de Cápsula Endoscópica

Imágenes modificadas de timmpllc.weebly.com, www.medtronic.com



Antes de la cápsula endoscópica:

- No deberá tomar aspirina, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno o cualquier analgésico / antiinflamatorio 30 días antes del procedimiento.
- No deberá tomar hierro oral 3 días antes del procedimiento
- Es muy importante informar a su médico de TODOS los medicamentos que tome de manera habitual o que haya tomado en la última semana. Algunos de los medicamentos que se contraindican a la realización de la cápsula endoscópica son: fármacos para la incontinencia urinaria, para el tratamiento del Alzheimer, o el Parkinson, fármacos para tratamiento de la depresión, de algunas enfermedades respiratorias crónicas, fármacos para el dolor que sean derivados de la morfina, la codeína o similares al tramadol, medicamentos para conciliar el sueño o hipnóticos, entre otros muchos.
- Un día antes del estudio deberá tomar una preparación especial que le causará diarrea, esto con el objetivo de que su intestino esté limpio de materia fecal y se puedan obtener adecuadas imágenes. Doce horas antes del estudio deberá limitar su dieta a líquidos y deberá acudir con ayuno de 8 horas.

El día del estudio:

La cápsula endoscópica es un procedimiento ambulatorio. Es decir, no es necesario pasar la noche en un hospital o una clínica. El estudio será realizado por médicos especialmente capacitados y con Certificación Vigente del Consejo Mexicano de Endoscopia Gastrointestinal. Este estudio no genera dolor ni molestias, excepto la deglución de la cápsula.

Posterior a ingerir la cápsula endoscópica:

- Podrá tomar líquidos a las 2 horas y una comida ligera a las 4 horas.
- Se le solicitará no realizar ejercicio o actividades que pudieran desprender los parches de la piel durante el estudio. Mientras dure el estudio no podrá realizarse Resonancias Magnéticas.
- En la tarde o al día siguiente, los parches y el procesador serán retirados. La cápsula es desechable y por lo general sale excretada en sus heces, esto puede demorar hasta 96 horas.

Riesgos y molestias relacionadas con el estudio:

Limpieza del intestino

- La preparación para el estudio incluye limitar su dieta un día antes. El laxante que deberá tomar produce diarrea abundante y líquida. Es importante que tenga un baño cerca. Puede despertar en la noche con necesidad de ir al baño. Podría experimentar náusea, gases, distensión abdominal, cansancio y evacuaciones frecuentes.
- En caso de no completar la preparación o no seguir las instrucciones, el colon podría no estar suficientemente limpio y el procedimiento se reprogramaría o cancelaría.

Cápsula Endoscópica Inalámbrica. (CEI)

- La CEI es un procedimiento que se realiza de manera habitual para el estudio de distintas enfermedades del intestino delgado, por lo que se considera como un estudio generalmente seguro. Sin embargo, como cualquier procedimiento, tiene riesgos potenciales.
- El efecto adverso más importante es la retención de la CEI, es decir, que no se evacúe. Esto sucede en muy raras ocasiones (1.3%) en pacientes con algún factor de riesgo.
- En caso de que usted no visualice la cápsula en sus evacuaciones en las siguientes 96 horas de terminado el estudio, será vigilado estrechamente con revisiones clínicas y radiografías de abdomen, en las que es muy fácil identificar la cápsula. Si no presenta ninguna molestia su seguimiento será médico. Sólo en caso de presentar dolor muy intenso, vómito, o incapacidad para evacuar podría requerir tratamiento quirúrgico.

Es importante mencionar que en caso de que ocurriera alguna complicación, usted recibirá toda la atención médica que requiera, por parte del CIENI y del INER sin costo para usted.

Información Adicional.

Las muestras de sangre periférica se almacenarán por tiempo indefinido en el CIENI. Las muestras serán preservadas en congelación para realizar, solo si usted lo autoriza, procedimientos de investigación en el futuro. Las imágenes obtenidas podrán ser utilizadas en publicaciones futuras.

Los datos obtenidos de todas las consultas médicas y de todos los estudios de laboratorio que le realicemos, se consignarán en su expediente clínico del INER y se utilizarán para los propósitos de nuestro proyecto, siempre de manera confidencial. Es decir, usted nunca será nombrado por ningún motivo en reuniones ni publicaciones científicas en donde se expongan los resultados de nuestras investigaciones.

Las muestras y los datos clínicos serán compartidos con grupos de investigadores de varios países del mundo, reconocidos científicamente, para aumentar al máximo las posibilidades de contribuir con nuevos conocimientos.

Es muy importante aclarar que no se le administrarán medicamentos experimentales, ni se le dará ningún tratamiento que usted no requiera.



Beneficios.

La realización de una cápsula endoscópica podría tener un beneficio clínico para usted ya que este estudio permite el escrutinio de pólipos, cáncer, u otra anomalía detectada incidentalmente. En caso de identificar algún hallazgo de importancia clínica, se le referirá al especialista correspondiente. El costo de su seguimiento no será cubierto por este protocolo.

La información obtenida de este estudio, permitirá a los investigadores aprender más sobre la relación del intestino y el VIH; esperamos que esta información ayude al control de la enfermedad.

No habrá ninguna remuneración económica por su participación en el estudio. Su participación en esta investigación conlleva una vigilancia de la infección por VIH que es más estrecha que la que recomiendan las guías nacionales e internacionales de atención. La investigación contempla la realización de algunas pruebas de laboratorio que son útiles y necesarias para su seguimiento clínico adecuado, y que no tendrán costos para usted. Estas pruebas incluyen los estudios de serología para VIH (si se requiere), carga viral de VIH en plasma, conteo de linfocitos T CD4+ y otras subpoblaciones, genotipo de VIH para saber si su virus es sensible o resistente al tratamiento antirretroviral que recibe o recibirá, biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos, marcadores inflamatorios y tipificación de genes HLA. Varios de esos estudios no son rutinarios y posiblemente usted podría beneficiarse con ellos. Por ejemplo, con la determinación de los marcadores de inflamación podríamos saber si usted tiene un mayor riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, metabólicas o inclusive cáncer. Con su participación en este estudio, usted ayudaría a la investigación del VIH/SIDA en México y probablemente a nivel internacional que busca contribuir a identificar estrategias para la erradicación del VIH del cuerpo humano o por lo menos a un mejor control de la infección.

Costos

Todos los gastos requeridos para realizar esta investigación, tales como la atención clínica con los médicos del CIENI, toma de muestra sanguínea, pruebas de laboratorio y procedimientos quirúrgicos, serán cubiertos por el INER durante el tiempo que dure el estudio o mientras Ud. decida participar en él. Es importante aclarar que el INER no se hará responsable de los costos de la atención, las consultas, los procedimientos clínicos y quirúrgicos, ni de los medicamentos que no estén relacionados con nuestra investigación.

Participación voluntaria y retiro

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Esto implica que usted tiene total libertad de decidir si participa o no. No debe haber ninguna presión de ninguna persona del CIENI ni de otras áreas del INER, que le obliguen a participar. Si usted decide no participar, su decisión será respetada y no habrá sanciones ni represalias por ello. Si usted decide participar, puede retirarse de este estudio (interrumpir su participación) en cualquier momento que usted quiera. Cualquiera de esas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica y de laboratorio, trato de médicos y personal) que usted obtiene como paciente del INER no cambiarán. Su tratamiento y su relación con los médicos y organizadores que participan en esta investigación no serán afectados en ningún momento si usted decide abandonar el estudio.

Es importante mencionar que su participación en este estudio podría darse por terminada por el médico o por el INER por cualquiera de las siguientes razones:

- Si Usted requiere medicamentos adicionales que puedan interferir con los objetivos de estudio.
- Si Usted no toma el tratamiento tal como se le ha indicado.
- Si Usted no acude a las citas de seguimiento programadas en la investigación.
- Por recomendación de su médico tratante.



Responsabilidades de los participantes

Es recomendable que, mientras forme parte de esta investigación, siga al pie de la letra las indicaciones que reciba por parte de los médicos que dirigen el estudio: Es importante que tome sus medicamentos como se le ha indicado y que cumpla formalmente con las citas para revisión clínica, estudios de laboratorio, toma de muestras y estudios programados. Usted deberá mencionar a su médico si presenta molestias relacionadas con los procedimientos del estudio. Usted deberá seguir las recomendaciones dadas por su médico después de la cirugía.

Confidencialidad

Los registros médicos que contienen sus datos, así como el consentimiento informado autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos por las siguientes instituciones nacionales o extranjeras para realizar inspecciones de calidad durante el desarrollo del proyecto:

- Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México).
- La Secretaría de Salud (México)
- Agencias del Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS, EUA).
- Agencias gubernamentales de otros países.

Estas instituciones podrían conocer su identidad, pero siempre respetarán su privacidad. Usted no será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio se presentan en reuniones científicas o en publicaciones. Su identidad no formará parte de los resultados de este estudio cuando se compartan con otros grupos o si son publicados en el medio científico y académico especializado.

Resultados del Estudio

Usted podrá solicitar los resultados de los estudios realizados en el protocolo de investigación y recibir información que requiera para decidir si desea continuar como participante en nuestras investigaciones.

Dudas y comentarios

Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a su médico tratante, así como al responsable de esta investigación, el Dr. Santiago Ávila Ríos, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), en la dirección y teléfonos indicados en la primera página de este documento o a su celular +55 1510-3322. Del mismo modo, usted puede optar por dirigirse a la Lic. Adriana Espinosa Jove, Presidenta del Comité de Ética en Investigación del INER (Tel. 5487 1700, Ext. 5254), el órgano encargado de vigilar la investigación del Instituto, que se encuentra en la Unidad de Investigación INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI (Tlalpan), 14080 Ciudad de México, México



CONSENTIMIENTO

Me han proporcionado la hoja de consentimiento informado. Me han explicado con detalle los métodos que se realizarán en este estudio, particularmente en la obtención de imágenes por cápsula endoscópica. He hablado directamente con el

Dr. _____ < _____

quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas con respecto a este estudio.

Todas mis dudas han sido aclaradas.

Acepto donar hasta 95 mililitros de mi sangre e imágenes del intestino capturadas por cápsula endoscópica, para que se estudien sus componentes. Sé y he aceptado que guardarán por tiempo indefinido las muestras de mi sangre y las imágenes obtenidas por cápsula endoscópica y que podrán ser estudiadas nuevamente en el futuro en el contexto de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH que se conduce en el CIENI, siempre y cuando lo apruebe el Comité de ética en Investigación del propio Instituto (INER). Finalmente, estoy consciente que podrían presentarse efectos adversos relacionados con la obtención de imágenes de intestino capturadas por cápsula endoscópica.

Al firmar este documento:

- Doy mi consentimiento para que los datos que sean recabados durante las consultas médicas, así como los resultados de los exámenes de laboratorio, se utilicen para cumplir los objetivos del protocolo y para realizar investigación clínica.
- Doy mi consentimiento a terceros para tener acceso a mi expediente clínico, siempre y cuando la información sea empleada para lograr los objetivos del proyecto y sea manejada de manera confidencial.
- Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en el momento que yo lo decida. Sé que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.
- Autorizo la revelación de mis registros médicos a las instituciones nacionales, como el comité de ética en investigación del INER o la COFEPRIS de la Secretaría de Salud de México, o internacionales como la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, en el caso de que sean requeridos para realizar auditorías o inspecciones de calidad de la investigación.
- He comprendido que no seré identificado en el caso de que los resultados que se obtengan en el estudio de mi sangre y mis datos clínicos se publiquen en reuniones o revistas científicas nacionales o internacionales.
- Acepto que mis células obtenidas por leucoforesis sean enviadas a otros laboratorios para establecer colaboraciones científicas internacionales con el fin de cumplir los objetivos del estudio.

Al firmar este consentimiento no renuncio a los derechos legales que tienen las personas que forman parte de un protocolo de investigación.



CARTA DE CONSENTIMIENTO ESPECÍFICO PARA PERMITIR INVESTIGACIONES CON MATERIAL GENÉTICO

- Me han proporcionado la hoja de consentimiento informado y me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio.
- He aceptado participar en el proyecto y además, mediante este consentimiento específico, permito que se realicen investigaciones con el material genético que se obtenga de mis muestras donadas, para cumplir los objetivos de la investigación.
- Me han aclarado que tales investigaciones serán realizadas exclusivamente para determinar si mis genes determinan una mayor o menor permanencia del virus en mis células o si se asocian o no a una protección o a mayor riesgo del avance de la enfermedad.
- Sé también que también podrían utilizarse para investigar si se asocian o no a una mayor frecuencia de enfermedades no relacionadas al SIDA como, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, metabólicas, autoinmunes, infecciosas, hematológicas o a cáncer.
- Sé que cuento con el derecho de saber todos los resultados que se obtengan de estos estudios.
- Es claro también que mis genes no serán utilizados para otros estudios tales como clonación ni en experimentos relacionados.

Doy mi consentimiento específico de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en el momento que yo lo decida. Sé bien que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.

Autorizo la revelación de mis registros médicos a las instituciones nacionales o internacionales (FDA, DHHS de los Estados Unidos, y el Comité de Ética en Investigación del INER), en el caso de que sean requeridos para realizar inspecciones sobre la calidad de la investigación. He comprendido que no seré identificado en el caso de que los resultados que se obtengan en el estudio de mi sangre y mis datos clínicos se publiquen en reuniones o revistas científicas nacionales o internacionales.

Al firmar este documento:

- Doy mi consentimiento para que los datos genéticos que sean recabados durante esta investigación sean utilizados para cumplir los objetivos del protocolo de investigación.
- Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en el momento que yo lo decida. Sé que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.
- Acepto que mi material genético sea enviado a otros laboratorios para establecer colaboraciones científicas internacionales con el fin de cumplir los objetivos del estudio.
- Al firmar este consentimiento no renuncio a los derechos legales que tienen las personas que forman parte de un protocolo de investigación.





LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA ES VOLUNTARIA

Me he quedado con una copia de este documento y con una copia de la Declaración de Derechos de las personas que participan en investigaciones. Adicionalmente, acepto que se realice investigación con mi material genético, solo para cumplir los objetivos descritos en esta investigación. Al firmar este consentimiento, acepto participar en el protocolo de investigación donando muestras sanguíneas e imágenes de intestino capturadas por cápsula endoscópica. Sin embargo, aun firmándolo, no renuncio a los derechos legales que tienen las personas que forman parte de una investigación científica.

Nombre completo (persona que participa en el estudio):

Dirección: _____

Fecha: _____ Firma: _____

Testigo 1 (nombre completo)

Dirección: _____

Parentesco con el paciente: _____

Fecha: _____ Firma: _____

Testigo 2 (nombre completo)

Dirección: _____

Parentesco con el paciente _____

Fecha: _____ Firma: _____

Nombre del Médico / Investigador que realizó la discusión de este documento:

Dirección: _____

Fecha: _____ Firma: _____

Dr. Santiago Ávila Ríos (Investigador Principal). _____

Dr. Akio Ricardo Murakami Ogasawara (Responsable Clínico) _____



DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACIÓN

Los derechos que se describen enseguida son los que deben tener todas las personas que aceptan la invitación para participar en un estudio de investigación.

Por ser una persona que participa en una investigación, yo tengo los siguientes derechos:

- Que me expliquen de qué se trata el estudio y qué están tratando de encontrar. Es decir, debo saber con todo detalle los objetivos de investigación.
- Que me digan exactamente qué me sucederá si participo en un estudio de investigación.
- Que me expliquen si alguno de los procedimientos, medicamentos o dispositivos que se emplearán en la investigación son diferentes de los que se usan en la práctica médica rutinaria. Si son diferentes, debo saber con exactitud en qué consisten las diferencias.
- Que me describan con precisión, y de manera que yo entienda bien, la frecuencia y la importancia de los riesgos a los que seré sometido y de los efectos adversos o molestias de las cosas que me ocurrirían por los propósitos de investigación.
- Que me digan si yo puedo esperar algún beneficio de mi participación y, si así fuera, cuál sería ese beneficio.
- Que me expliquen otras opciones que tengo y cómo esas opciones pueden ser mejores, iguales o peores que las de este estudio.
- Que me permitan hacer cualquier pregunta que se me ocurra respecto al estudio, antes de dar mi consentimiento para participar y también durante el curso del estudio, si decido participar.
- Que me digan qué tipos de tratamientos están disponibles para mí, en el caso de presentarse alguna complicación.
- Puedo negarme a participar en el estudio y, si decido hacerlo, puedo cambiar mi decisión acerca de mi participación después de que haya comenzado el estudio. Esta decisión no afectará mis derechos para recibir la atención médica que yo recibiría si no estuviera en el estudio.
- A recibir una copia del documento o de la forma escrita de mi consentimiento para participar en esta investigación.
- Nadie puede ni debe presionarme cuando yo esté considerando tomar la decisión de participar o no en el estudio.

Si tengo otras dudas o preguntas, puedo solicitar que me las resuelvan al Dr. Santiago Ávila Ríos, (Tel. 5666-7985, extensiones 151 y 163 o a su teléfono celular +55 1510-9826), Investigador Principal y Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), o a los médicos e investigadores que participan en este proyecto. Además, puedo establecer comunicación con el Comité de Ética en Investigación del INER, que se preocupa por la protección de los voluntarios de los proyectos, con su presidenta la Lic. Adriana Espinosa Jove de 9:00am a 4:00pm, de lunes a viernes a los teléfonos: 52 55 5487 1700 ext. 5254, o puedo escribir al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx

Recibí _____ Fecha: _____
Nombre y apellidos



ANEXO 5. Consentimiento Informado para participantes VIH negativo aprobado por el Comité de Ética e Investigación



Cohorte de Investigación Longitudinal
para el Estudio del VIH/SIDA en México
**DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA
GRUPO CONTROL**



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA
GRUPO CONTROL**



Título del protocolo: Cohorte de Investigación Longitudinal para el Estudio del VIH/SIDA en México.

Patrocinador: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Sitio de Investigación: Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI).

Investigador Principal y Responsable Científico: Dr. Santiago Ávila Ríos, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Dirección: Calzada de Tlalpan #4502, Col. Sección XVI CP 14080, Ciudad de México, México.
Teléfonos: 5171-4697 o 5171-4718

Correo electrónico: santiago.avila@cieni.org.mx

Esta es una invitación para que usted participe voluntariamente en una investigación, mediante la donación **de sangre y de imágenes obtenidas por cápsula endoscópica**.

Si usted acepta participar, integrará el grupo que llamamos "de control", es decir el grupo de personas que no tiene la infección por VIH. A continuación, se enlistan algunas de las razones por las que podría ayudar con su participación a cumplir los objetivos de esta investigación:

- Usted es considerado como una persona sana sin riesgo o con bajo riesgo de adquirir VIH
- Usted tiene alto riesgo de adquirir la infección por VIH
- Usted tiene alguna enfermedad, pero no tiene VIH

La obtención de su sangre y las imágenes de su intestino podría ayudar a entender las causas por las que no es posible erradicar al VIH o, por lo menos, a entender por qué las personas con VIH no pueden controlar el virus y otras enfermedades

El Dr. Santiago Ávila Ríos, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), conduce una investigación para saber qué elementos determinan, en una persona con VIH, el control de la replicación del virus antes y después del tratamiento antirretroviral (TAR). Además, pretende identificar las causas de la permanencia de VIH en tejidos del organismo humano, que obstaculizan su eliminación aun con un tratamiento antirretroviral eficaz.

El estudio se realizará con el apoyo económico del gobierno federal mexicano. Los comités de investigación y el de ética en investigación del INER evaluaron y aprobaron esta investigación.

En México y en otras partes del mundo, las instituciones reguladoras de la salud requieren que usted esté completamente informado de la naturaleza, objetivos y riesgos de cada uno de los diferentes procedimientos que se harán para realizar este estudio. Si el documento contiene palabras desconocidas o frases que no comprenda bien, por favor tenga libertad de preguntar al médico, o al personal con quien discute este documento, para resolver todas sus dudas. Usted debe recibir una copia de este documento, llamado carta de consentimiento informado.

Usted deberá llevarse la carta de consentimiento informado a su casa, para que tome la decisión de participar o no en la investigación a la que se le invita, una vez que haya tenido la asesoría que usted considere, contando con el tiempo que requiera.

Antes de que usted firme esta carta de consentimiento le preguntaremos si ha leído y comprendido su contenido, especialmente los riesgos o beneficios potenciales que pueden resultar de su participación en esta investigación. Si usted lo desea, puede pedir una copia del proyecto de investigación completo, es decir el documento que describe con detalle las razones por las que se realiza este estudio, sus alcances y todos los procedimientos que se harán con las muestras que usted donará voluntariamente para la investigación.

RESUMEN DEL PROYECTO: Importancia y objetivos del estudio.

Se sabe ahora que el tratamiento antirretroviral (TAR) controla muy bien al VIH y con ello detiene el avance de la enfermedad. Esto hace de la infección por VIH una enfermedad crónica, controlable, que por un tiempo largo no pone en riesgo la vida de las personas infectadas siempre y cuando reciban el tratamiento y vigilancia adecuados.

Sin embargo, el TAR tiene algunas limitantes enlistadas a continuación:

El TAR no puede eliminar al VIH del cuerpo de las personas infectadas.

Se ha demostrado que el VIH evita su eliminación porque se esconde dentro de células que impiden el efecto tratamiento antirretroviral. Estas células son auténticos reservorios o escondites del virus. Los reservorios se localizan en varios tejidos: los tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, amígdalas, adenoides), el intestino, la médula ósea y probablemente también en otros tejidos no bien identificados. El tamaño del reservorio en esos tejidos es mucho mayor que en la sangre y ese tamaño se mantiene estable en las personas con VIH tratadas por más de 10 años, aunque tengan la carga viral indetectable. Por tanto, es fundamental estudiar por qué y cómo se forma el reservorio de VIH, definir bien cómo funciona, qué lo mantiene y por qué permanece estable tanto tiempo. Descubrir las respuestas a estas interrogantes, ayudará a proponer y desarrollar nuevas estrategias para erradicar ese escondite del VIH que impide la curación de la infección.

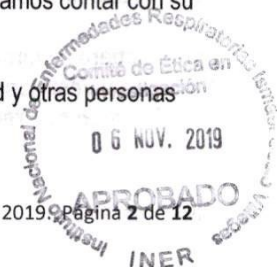
Las defensas del cuerpo, destruidas por el VIH, no se recuperan por completo.

El VIH destruye directa e indirectamente al sistema inmunitario (un sistema de defensas que tiene el cuerpo humano contra las infecciones). El tratamiento antirretroviral, por tanto, al controlar la replicación del virus produce la recuperación del sistema inmunitario. Sin embargo, la recuperación es solamente parcial en la mayoría de los pacientes. Solo los que inician el tratamiento antirretroviral muy tempranamente después de la infección, tienen las mayores oportunidades de recuperar casi totalmente el sistema de defensas. Lamentablemente la detección de personas con VIH en México ocurre en general muy tardíamente, cuando han pasado varios años de la infección y el virus ha destruido considerablemente el sistema inmunitario de las personas infectadas. Más aún, la disfunción inmunitaria se ha observado principalmente en estudios realizados en la sangre periférica de las personas con VIH y no en los tejidos linfoides, donde el virus se concentra y están distribuidos en todo el cuerpo humano, especialmente en el intestino, los ganglios linfáticos y la médula ósea. Para poder buscar estrategias que restauren totalmente la función del sistema inmunitario de la persona infectada, es necesario determinar con precisión las alteraciones que se producen en los tejidos linfoides, donde se genera la respuesta inmune y no solamente en la sangre periférica.

Importancia de la investigación científica en el CIENI

El CIENI del INER cuenta con la infraestructura humana multidisciplinaria conformada por clínicos e investigadores, infraestructura física constituida por laboratorios y equipos de investigación y colaboraciones internacionales (reconocido grupo de científicos en varias partes del mundo) para contribuir a responder las interrogantes descritas y ayudar en la búsqueda de nuevas estrategias que controlen mejor al VIH, siempre y cuando podamos contar con su participación voluntaria.

El CIENI del INER puede contribuir a entender mejor los fenómenos descritos antes solo si usted y otras personas participan donando sangre e imágenes de cápsula endoscópica.



**DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA
GRUPO CONTROL**

¿Cuál es la importancia de que usted, como parte del Grupo de Control participe en esta investigación?

En una investigación científica, estudiar una enfermedad exclusivamente en las personas que tienen la enfermedad (por ejemplo, el VIH), podría resultar en conclusiones erróneas si no se comparan los resultados con los de un grupo que no tenga la enfermedad y preferentemente, no exclusivamente, con los que tengan el riesgo de adquirir la enfermedad. Este grupo sirve, por tanto, como **control** para validar los resultados que se obtengan del estudio del grupo de personas con la enfermedad.

Por tanto, para que esta investigación tenga la mejor calidad y sobre toda que sus resultados puedan ser útiles a otros grupos de investigación en el mundo y potencialmente a las personas con VIH, su participación en el grupo de personas que no tienen la infección por VIH, o grupo de **Control**, es importante.

En concreto, los estudios que le hagamos a usted y a todas las personas que participen en el grupo de **control**, nos permitirá medir el funcionamiento normal del sistema inmunitario (o sistema de defensas del organismo humano) y lo compararemos con el funcionamiento de las personas que viven con VIH. Si el estudio lo hacemos no solamente en la sangre sino también en tejidos como el intestino, donde se generan las defensas contra los agentes externos, y comparamos los resultados en los grupos de estudio (con VIH) y de control (sin VIH), podríamos detectar, al observar las diferencias, los mecanismos que el VIH utiliza para evadir y destruir el sistema inmunitario. Si logramos estos objetivos, y su participación es muy importante para hacerlo, nuestra investigación podría contribuir a plantear o inclusive encontrar nuevas estrategias para el mejor control o la eliminación del VIH de la persona que vive con la infección.

¿Qué es el intestino?

El intestino es la porción del sistema digestivo que se encuentra entre el estómago y el ano. El intestino se divide en dos segmentos: el intestino grueso y el intestino delgado (Ver Figura 1). Su principal función es extraer los nutrientes de los alimentos. Sin embargo, el intestino también juega un papel importante en el control de bacterias, virus y parásitos que pueden ser ingeridos en los alimentos. Por esta razón, el intestino contiene una gran cantidad de células del sistema inmunitario (el sistema de defensas del cuerpo cuya función es el control de enfermedades). Entre estas células se encuentran los linfocitos T CD4+, que son las células que infecta el VIH.

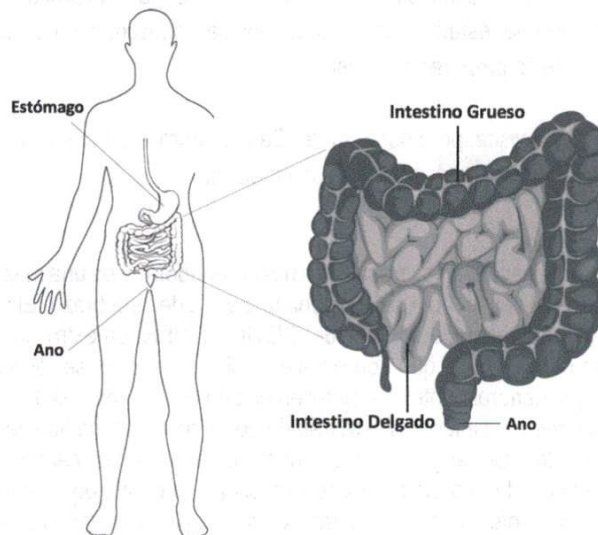


Figura 1. Intestino Grueso e Intestino Delgado

Imágenes modificadas de <https://catalog.niddk.nih.gov> y <http://wholelifebalance.com/>



¿Por qué es importante estudiar el tejido intestinal en la infección por VIH?

El intestino es el tejido que tiene la mayor cantidad de linfocitos T CD4+. Se estima que el intestino contiene entre el 60% y 80% de los linfocitos T CD4+ de todo el cuerpo. En comparación, la sangre solamente contiene entre el 1% y el 3%. Diversas investigaciones han demostrado que una porción de las células infectadas por el VIH, los linfocitos T CD4+, se encuentran de manera preferencial en el intestino. Los reservorios de VIH podrían sobrevivir por meses, incluso años en estos sitios. Las investigaciones del CIENI ayudaran a entender las razones por las que el virus prefiere esconderse en este tejido y podrían ayudar a diseñar nuevas estrategias de tratamiento contra el VIH en el futuro.

Objetivo General de la investigación:

Estudiar los factores virológicos, inmunológicos, anatómicos, celulares, moleculares y genéticos relacionados con:

- La permanencia del virus en el cuerpo humano a pesar del tratamiento antirretroviral eficaz
- La evolución de la enfermedad por VIH en la población mexicana.
- Los efectos del tratamiento antirretroviral a largo plazo.

Objetivos Particulares de la Donación de imágenes de intestino:

- Describir los cambios presentes en la mucosa del tubo digestivo secundarios a la infección por VIH en diferentes etapas de la enfermedad.

Procedimientos, Riesgos y Molestias.

Para donar imágenes del intestino es necesario que usted realice tres visitas al CIENI:

- Primera Visita

Durante la primera visita, los médicos del CIENI determinarán si su estado de salud es adecuado para realizar un estudio de cápsula endoscópica. Por esta razón, le realizarán estudios de sangre y una valoración médica detallada, la cual puede incluir un interrogatorio y exploración física. Es necesario que se presente en ayuno de al menos 8 horas.

- Segunda Visita

Durante la segunda visita se tomará otra muestra de sangre, se le entregará un procesador de imágenes que llevará en un cinturón durante el tiempo del estudio e ingerirá la cápsula endoscópica. Es necesario que se presente en ayuno de al menos 8 horas y previa preparación intestinal.

- Tercera visita.

Será el mismo día de la segunda visita, pero por la tarde. Se le retirará el procesador de imágenes y será valorado por el personal médico del CIENI en caso de referir alguna molestia.

Donación de una muestra de sangre:

Para llevar a cabo esta investigación, necesitamos trabajar en nuestros laboratorios una muestra de sangre. Para obtener la muestra de su sangre, con material desechable se punciona una vena del antebrazo. El procedimiento es seguro si lo realiza el personal capacitado y experimentado como el del CIENI del INER. La extracción de sangre produce dolor y molestias en el sitio de punción con la aguja, que son pasajeras. En ocasiones, se forman moretones en la piel, por pequeños derrames de sangre, que generalmente desaparecen en una o dos semanas. Excepcionalmente hay infección del sitio de la punción. Si esto ocurriera, la infección será tratada por el personal médico del CIENI sin costo para usted. Se obtendrá un máximo de 95 mililitros de sangre (unas 9 cucharadas soperas) en cada una sus visitas calendarizadas para este protocolo. Aunque esta cantidad podría parecerle excesiva, sobre todo por el número de tubos que se utiliza, usted debe saber que no tiene ningún efecto sobre su estado de salud. Las muestras de sangre y sus componentes se almacenarán por tiempo indefinido en el CIENI para realizar, solo si usted lo autoriza, procedimientos de investigación en el futuro.

Imágenes de intestino obtenidas por cápsula endoscópica:

La cápsula endoscópica consiste en una video cámara del tamaño de una cápsula, la cual debe de ser ingerida con un vaso de agua. Mide 2.5cm aproximadamente, tiene su propia fuente de luz y toma fotografías durante su trayecto a través del intestino. Las fotos que obtienen, se mandan a un procesador de imágenes que usted llevará en un cinturón cerca del cuerpo y en algunos casos conectado a unos sensores en la piel del abdomen. Una vez terminado el estudio, el doctor podrá ver estas imágenes en una computadora.

La cápsula endoscópica un estudio específico para revisar el intestino delgado, el cual no puede verse ni por panendoscopia ni colonoscopia. (Ver Figura 2).

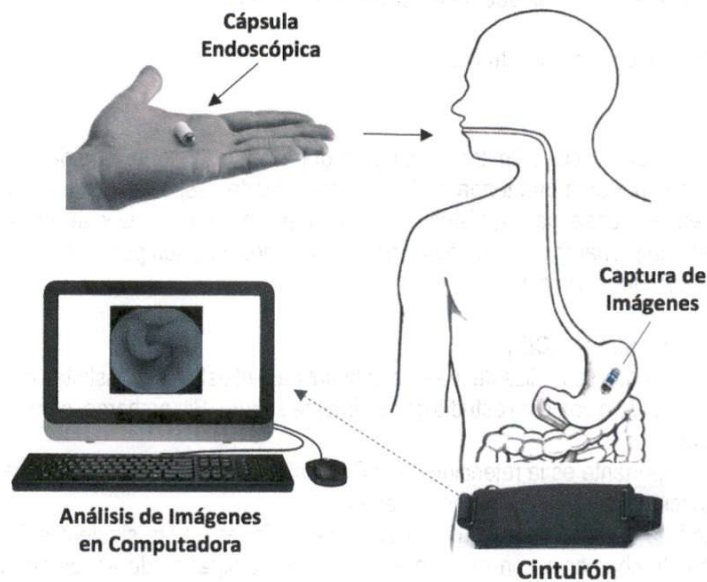


Figura 2. Procedimiento de Cápsula Endoscópica

Imágenes modificadas de timmpllc.weebly.com, www.medtronic.com



Antes de la cápsula endoscópica:

- No deberá tomar aspirina, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno o cualquier analgésico / antiinflamatorio 30 días antes del procedimiento.
- No deberá tomar hierro oral 3 días antes del procedimiento
- Es muy importante informar a su médico de TODOS los medicamentos que tome de manera habitual o que haya tomado en la última semana. Algunos de los medicamentos que se contraindican a la realización de la cápsula endoscópica son: fármacos para la incontinencia urinaria, para el tratamiento del Alzheimer, o el Parkinson, fármacos para tratamiento de la depresión, de algunas enfermedades respiratorias crónicas, fármacos para el dolor que sean derivados de la morfina, la codeína o similares al tramadol, medicamentos para conciliar el sueño o hipnóticos, entre otros muchos.
- Un día antes del estudio deberá tomar una preparación especial que le causará diarrea, esto con el objetivo de que su intestino esté limpio de materia fecal y se puedan obtener adecuadas imágenes. Doce horas antes del estudio deberá limitar su dieta a líquidos y deberá acudir con ayuno de 8 horas.

El día del estudio:

La cápsula endoscópica es un procedimiento ambulatorio. Es decir, no es necesario pasar la noche en un hospital o una clínica. El estudio será realizado por médicos especialmente capacitados y con Certificación Vigente del Consejo Mexicano de Endoscopia Gastrointestinal. Este estudio no genera dolor ni molestias, excepto la deglución de la cápsula.

Posterior a ingerir la cápsula endoscópica:

- Podrá tomar líquidos a las 2 horas y una comida ligera a las 4 horas.
- Se le solicitará no realizar ejercicio o actividades que pudieran despegar los parches de la piel durante el estudio. Mientras dure el estudio no podrá realizarse Resonancias Magnéticas.
- En la tarde o al día siguiente, los parches y el procesador serán retirados. La cápsula es desechable y por lo general sale excretada en sus heces, esto puede demorar hasta 96 horas.

Riesgos y molestias relacionadas con el estudio:

Limpieza del intestino

- La preparación para el estudio incluye limitar su dieta un día antes. El laxante que deberá tomar produce diarrea abundante y líquida. Es importante que tenga un baño cerca. Puede despertar en la noche con necesidad de ir al baño. Podría experimentar náusea, gases, distensión abdominal, cansancio y evacuaciones frecuentes.
- En caso de no completar la preparación o no seguir las instrucciones, el colon podría no estar suficientemente limpio y el procedimiento se reprogramaría o cancelaría.

Cápsula Endoscópica Inalámbrica. (CEI)

- La CEI es un procedimiento que se realiza de manera habitual para el estudio de distintas enfermedades del intestino delgado, por lo que se considera como un estudio generalmente seguro. Sin embargo, como cualquier procedimiento, tiene riesgos potenciales.
- El efecto adverso más importante es la retención de la CEI, es decir, que no se evacúe. Esto sucede en muy raras ocasiones (1.3%) en pacientes con algún factor de riesgo.
- En caso de que usted no visualice la cápsula en sus evacuaciones en las siguientes 96 horas de terminado el estudio, será vigilado estrechamente con revisiones clínicas y radiografías de abdomen, en las que es muy fácil identificar la cápsula. Si no presenta ninguna molestia su seguimiento será médico. Sólo en caso de presentar dolor muy intenso, vómito, o incapacidad para evacuar podría requerir tratamiento quirúrgico.

Es importante mencionar que en caso de que ocurriera alguna complicación, usted recibirá toda la atención médica que requiera, por parte del CIENI y del INER sin costo para usted.

Información Adicional.

Las muestras de sangre periférica se almacenarán por tiempo indefinido en el CIENI. Las muestras serán preservadas en congelación para realizar, solo si usted lo autoriza, procedimientos de investigación en el futuro. Las imágenes obtenidas podrán ser utilizadas en publicaciones futuras.

Los datos obtenidos de todas las consultas médicas y de todos los estudios de laboratorio que le realicemos, se consignarán en su expediente clínico del INER y se utilizarán para los propósitos de nuestro proyecto, siempre de manera confidencial. Es decir, usted nunca será nombrado por ningún motivo en reuniones ni publicaciones científicas en donde se expongan los resultados de nuestras investigaciones.

Las muestras y los datos clínicos serán compartidos con grupos de investigadores de varios países del mundo, reconocidos científicamente, para aumentar al máximo las posibilidades de contribuir con nuevos conocimientos.

Es muy importante aclarar que no se le administrarán medicamentos experimentales, ni se le dará ningún tratamiento que usted no requiera.



Beneficios.

La realización de una cápsula endoscópica podría tener un beneficio clínico para usted ya que este estudio permite el escrutinio de pólipos, cáncer, u otra anomalía detectada incidentalmente. En caso de identificar algún hallazgo de importancia clínica, se le referirá al especialista correspondiente. El costo de su seguimiento no será cubierto por este protocolo.

La información obtenida de este estudio, permitirá a los investigadores aprender más sobre la relación del intestino y el VIH; esperamos que esta información ayude al control de la enfermedad.

No habrá ninguna remuneración económica por su participación en el estudio. Se le realizará de manera gratuita las pruebas para diagnosticar la infección por los virus VIH, de hepatitis B y de hepatitis C y para detectar otras enfermedades. La investigación contempla la realización de algunas pruebas de laboratorio que son útiles para conocer su estado general de salud. Estas pruebas incluyen los estudios llamados biometría hemática, química sanguínea, perfil de lípidos, marcadores inflamatorios y tipificación de genes HLA. Varios de esos estudios no son rutinarios y posiblemente usted podría beneficiarse con ellos. Por ejemplo, con la determinación de los marcadores de inflamación podríamos saber si usted tiene un mayor riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, metabólicas o inclusive cáncer. Con su participación en este estudio, usted ayudaría a la investigación del VIH/SIDA en México y probablemente a nivel internacional, que busca contribuir a identificar estrategias para la erradicación del VIH del cuerpo humano o por lo menos un controlar mejor de la infección.

Finalmente, si usted es una persona con riesgo de adquirir la infección por VIH, el protocolo de investigación podría otorgar de manera gratuita, al menos temporalmente, mientras tengamos el presupuesto para ello, el tratamiento profiláctico pre-exposición (también llamado PreP). Los investigadores le realizarán un cuestionario para determinar si usted es candidato a recibir este beneficio. Además, le explicarán la forma en la que usted debe tomar este medicamento.

Costos

Todos los gastos requeridos para realizar esta investigación, tales como la atención clínica con los médicos del CIENI, toma de muestra sanguínea, pruebas de laboratorio y procedimientos quirúrgicos, serán cubiertos por el INER durante el tiempo que dure el estudio o mientras Ud. decida participar en él. Es importante aclarar que el INER no se hará responsable de los costos de la atención, las consultas, los procedimientos clínicos y quirúrgicos, ni de los medicamentos que no estén relacionados con nuestra investigación.

Participación voluntaria y retiro

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Esto implica que usted tiene total libertad de decidir si participa o no. No debe haber ninguna presión de ninguna persona del CIENI ni de otras áreas del INER, que le obliguen a participar. Si usted decide no participar, su decisión será respetada y no habrá sanciones ni represalias por ello. Si usted decide participar, puede retirarse de este estudio (interrumpir su participación) en cualquier momento que usted quiera. Cualquiera de esas decisiones será respetada y los beneficios (atención clínica y de laboratorio, trato de médicos y personal) que usted obtiene como paciente del INER no cambiarán. Su tratamiento y su relación con los médicos y organizadores que participan en esta investigación no serán afectados en ningún momento si usted decide abandonar el estudio.

Es importante mencionar que su participación en este estudio podría darse por terminada por el médico o por el INER por cualquiera de las siguientes razones:

- Si Usted requiere medicamentos adicionales que puedan interferir con los objetivos de estudio.
- Si Usted no toma el tratamiento tal como se le ha indicado.
- Si Usted no acude a las citas de seguimiento programadas en la investigación.
- Por recomendación de su médico tratante.



Responsabilidades de los participantes

Es recomendable que, mientras forme parte de esta investigación, siga al pie de la letra las indicaciones que reciba por parte de los médicos que dirigen el estudio: Es importante que tome sus medicamentos como se le ha indicado y que cumpla formalmente con las citas para revisión clínica, estudios de laboratorio, toma de muestras y estudios programados. Usted deberá mencionar a su médico si presenta molestias relacionadas con los procedimientos del estudio. Usted deberá seguir las recomendaciones dadas por su médico después de la cirugía.

Confidencialidad

Los registros médicos que contienen sus datos, así como el consentimiento informado autorizado por usted con su firma, podrían ser requeridos por las siguientes instituciones nacionales o extranjeras para realizar inspecciones de calidad durante el desarrollo del proyecto:

- Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (México).
- La Secretaría de Salud (México)
- Agencias del Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS, EUA).
- Agencias gubernamentales de otros países.

Estas instituciones podrían conocer su identidad, pero siempre respetarán su privacidad. Usted no será identificado(a) en ningún caso si los resultados de este estudio se presentan en reuniones científicas o en publicaciones. Su identidad no formará parte de los resultados de este estudio cuando se compartan con otros grupos o si son publicados en el medio científico y académico especializado.

Resultados del Estudio

Usted podrá solicitar los resultados de los estudios realizados en el protocolo de investigación y recibir información que requiera para decidir si desea continuar como participante en nuestras investigaciones.

Dudas y comentarios

Si usted tiene dudas o comentarios sobre su participación o sobre el estudio mismo, puede consultar en todo momento a su médico tratante, así como al responsable de esta investigación, el Dr. Santiago Ávila Ríos, Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI), en la dirección y teléfonos indicados en la primera página de este documento o a su celular +55 1510-3322. Del mismo modo, usted puede optar por dirigirse a la Lic. Adriana Espinosa Jove, Presidenta del Comité de Ética en Investigación del INER (Tel. 5487 1700, Ext. 5254), el órgano encargado de vigilar la investigación del Instituto, que se encuentra en la Unidad de Investigación INER, Calzada de Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI (Tlalpan), 14080 Ciudad de México, México.



CONSENTIMIENTO

Me han proporcionado la hoja de consentimiento informado. Me han explicado con detalle los métodos que se realizarán en este estudio, particularmente en la obtención de imágenes por cápsula endoscópica. He hablado directamente con el

Dr. _____

, quien ha respondido a mi satisfacción todas mis preguntas con respecto a este estudio.

Todas mis dudas han sido aclaradas.

Acepto donar hasta 95 mililitros de mi sangre e imágenes del intestino capturadas por cápsula endoscópica, para que se estudien sus componentes. Sé y he aceptado que guardarán por tiempo indefinido las muestras de mi sangre y las imágenes obtenidas por cápsula endoscópica y que podrán ser estudiadas nuevamente en el futuro en el contexto de otros proyectos de investigación sobre la infección por VIH que se conduce en el CIENI, siempre y cuando lo apruebe el Comité de ética en Investigación del propio Instituto (INER). Finalmente, estoy consciente que podrían presentarse efectos adversos relacionados con la obtención de imágenes de intestino capturadas por cápsula endoscópica.

Al firmar este documento:

- Doy mi consentimiento para que los datos que sean recabados durante las consultas médicas, así como los resultados de los exámenes de laboratorio, se utilicen para cumplir los objetivos del protocolo y para realizar investigación clínica.
- Doy mi consentimiento a terceros para tener acceso a mi expediente clínico, siempre y cuando la información sea empleada para lograr los objetivos del proyecto y sea manejada de manera confidencial.
- Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en el momento que yo lo decida. Sé que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.
- Autorizo la revelación de mis registros médicos a las instituciones nacionales, como el comité de ética en investigación del INER o la COFEPRIS de la Secretaría de Salud de México, o internacionales como la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, en el caso de que sean requeridos para realizar auditorías o inspecciones de calidad de la investigación.
- He comprendido que no seré identificado en el caso de que los resultados que se obtengan en el estudio de mi sangre y mis datos clínicos se publiquen en reuniones o revistas científicas nacionales o internacionales.
- Acepto que mis células obtenidas por leucoforesis sean enviadas a otros laboratorios para establecer colaboraciones científicas internacionales con el fin de cumplir los objetivos del estudio.

Al firmar este consentimiento no renuncio a los derechos legales que tienen las personas que forman parte de un protocolo de investigación.



CARTA DE CONSENTIMIENTO ESPECÍFICO PARA PERMITIR INVESTIGACIONES CON MATERIAL GENÉTICO

- Me han proporcionado la hoja de consentimiento informado y me han explicado los métodos y procedimientos que me realizarán en este estudio.
- He aceptado participar en el proyecto y además, mediante este consentimiento específico, permito que se realicen investigaciones con el material genético que se obtenga de mis muestras donadas, para cumplir los objetivos de la investigación.
- Me han aclarado que tales investigaciones serán realizadas exclusivamente para determinar si mis genes determinan una mayor o menor permanencia del virus en mis células o si se asocian o no a una protección o a mayor riesgo del avance de la enfermedad.
- Sé también que también podrían utilizarse para investigar si se asocian o no a una mayor frecuencia de enfermedades no relacionadas al SIDA como, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, metabólicas, autoinmunes, infecciosas, hematológicas o a cáncer.
- Sé que cuento con el derecho de saber todos los resultados que se obtengan de estos estudios.
- Es claro también que mis genes no serán utilizados para otros estudios tales como clonación ni en experimentos relacionados.

Doy mi consentimiento específico de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en el momento que yo lo decida. Sé bien que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.

Autorizo la revelación de mis registros médicos a las instituciones nacionales o internacionales (FDA, DHHS de los Estados Unidos, y el Comité de Ética en Investigación del INER), en el caso de que sean requeridos para realizar inspecciones sobre la calidad de la investigación. He comprendido que no seré identificado en el caso de que los resultados que se obtengan en el estudio de mi sangre y mis datos clínicos se publiquen en reuniones o revistas científicas nacionales o internacionales.

Al firmar este documento:

- Doy mi consentimiento para que los datos genéticos que sean recabados durante esta investigación sean utilizados para cumplir los objetivos del protocolo de investigación.
- Doy mi consentimiento de participación en esta investigación y sé bien que puedo cancelarla o retirarme en el momento que yo lo decida. Sé que esto no tendrá repercusiones en mi atención como paciente de este Instituto.
- Acepto que mi material genético sea enviado a otros laboratorios para establecer colaboraciones científicas internacionales con el fin de cumplir los objetivos del estudio.
- Al firmar este consentimiento no renuncio a los derechos legales que tienen las personas que forman parte de un protocolo de investigación.





Cohorte de Investigación Longitudinal
para el Estudio del VIH/SIDA en México

**DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA
GRUPO CONTROL**



LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA ES VOLUNTARIA

Me he quedado con una copia de este documento y con una copia de la Declaración de Derechos de las personas que participan en investigaciones. Adicionalmente, acepto que se realice investigación con mi material genético, solo para cumplir los objetivos descritos en esta investigación. Al firmar este consentimiento, acepto participar en el protocolo de investigación donando muestras sanguíneas e imágenes de intestino capturadas por cápsula endoscópica. Sin embargo, aun firmándolo, no renuncio a los derechos legales que tienen las personas que forman parte de una investigación científica.

Nombre completo (persona que participa en el estudio):

Dirección: _____

Fecha: _____ Firma: _____

Testigo 1 (nombre completo)

Dirección: _____

Parentesco con el paciente: _____

Fecha: _____ Firma: _____

Testigo 2 (nombre completo)

Dirección: _____

Parentesco con el paciente _____

Fecha: _____ Firma: _____

Nombre del Médico / Investigador que realizó la discusión de este documento:

Dirección: _____

Fecha: _____ Firma: _____

Dr. Santiago Ávila Ríos (Investigador Principal). _____

Dr. Akio Ricardo Murakami Ogasawara (Responsable Clínico) _____





Cohorte de Investigación Longitudinal
para el Estudio del VIH/SIDA en México
DONACIÓN DE IMÁGENES POR CÁPSULA ENDOSCÓPICA
GRUPO CONTROL



DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE LAS PERSONAS EN EXPERIMENTACIÓN

Los derechos que se describen enseguida son los que deben tener todas las personas que aceptan la invitación para participar en un estudio de investigación.

Por ser una persona que participa en una investigación, yo tengo los siguientes derechos:

- Que me expliquen de qué se trata el estudio y qué están tratando de encontrar. Es decir, debo saber con todo detalle los objetivos de investigación.
- Que me digan exactamente qué me sucederá si participo en un estudio de investigación.
- Que me expliquen si alguno de los procedimientos, medicamentos o dispositivos que se emplearán en la investigación son diferentes de los que se usan en la práctica médica rutinaria. Si son diferentes, debo saber con exactitud en qué consisten las diferencias.
- Que me describan con precisión, y de manera que yo entienda bien, la frecuencia y la importancia de los riesgos a los que seré sometido y de los efectos adversos o molestias de las cosas que me ocurrirían por los propósitos de investigación.
- Que me digan si yo puedo esperar algún beneficio de mi participación y, si así fuera, cuál sería ese beneficio.
- Que me expliquen otras opciones que tengo y cómo esas opciones pueden ser mejores, iguales o peores que las de este estudio.
- Que me permitan hacer cualquier pregunta que se me ocurra respecto al estudio, antes de dar mi consentimiento para participar y también durante el curso del estudio, si decido participar.
- Que me digan qué tipos de tratamientos están disponibles para mí, en el caso de presentarse alguna complicación.
- Puedo negarme a participar en el estudio y, si decido hacerlo, puedo cambiar mi decisión acerca de mi participación después de que haya comenzado el estudio. Esta decisión no afectará mis derechos para recibir la atención médica que yo recibiría si no estuviera en el estudio.
- A recibir una copia del documento o de la forma escrita de mi consentimiento para participar en esta investigación.
- Nadie puede ni debe presionarme cuando yo esté considerando tomar la decisión de participar o no en el estudio.

Si tengo otras dudas o preguntas, puedo solicitar que me las resuelvan al Dr. Santiago Ávila Ríos (Tel. 5666-7985, extensiones 151 y 163 o a su teléfono celular +55 1510-9826), Investigador Principal y Jefe del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), o a los médicos e investigadores que participan en este proyecto. Además, puedo establecer comunicación con el Comité de Ética en Investigación del INER, que se preocupa por la protección de los voluntarios de los proyectos, con su presidenta la Lic. Adriana Espinosa Jove de 9:00am a 4:00pm, de lunes a viernes a los teléfonos: 52 55 5487 1700 ext. 5254, o puedo escribir al correo electrónico: ccybiner@yahoo.com.mx

Recibí _____ Fecha: _____
Nombre y apellidos



ANEXO 6. Carta de autorización de Bioseguridad



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD

Ciudad de México, a 13 de noviembre de 2018
DI/CB/PI/45/18

Estimado: Dr. Gustavo Reyes Terán
Asunto: Dictamen del Comité de Bioseguridad

APROBADO

Título del protocolo: "Cohorte de Investigación Longitudinal para el Estudio del VIH/SIDA en México"

FOLIO: 4518

Le informamos que su proyecto ha sido evaluado por este Comité y se ha encontrado que cumple con los requerimientos básicos para llevarse a cabo de manera segura en sus instalaciones.

Esta aprobación cubre exclusivamente las condiciones detalladas en el formato sometido a revisión, por lo que pierde validez si se realiza algún cambio en la población de estudio, el tipo de muestra, el material biológico, los procedimientos, el equipo o la infraestructura empleados.

Es fundamental que durante el desarrollo de este proyecto, se dé puntual cumplimiento a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Título Cuarto Capítulo I. La disposición final de los **RPBI y CRETI** procedentes de las técnicas utilizadas en el proyecto deberá realizarse de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA-1-2002, Protección Ambiental, Salud Ambiental, Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos-Clasificación y especificación de manejo, que se generan en establecimientos que presentan atención médica, coordinado para su efecto por la SEMARNAT y a los procedimientos propios de este Instituto.

Atentamente,

Q.F.B. Ma. Del Carmen Sarabia León
Secretaria del Comité de Bioseguridad
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas


INER INSTITUTO NACIONAL DE
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
RECIBIDO
20 NOV. 2018
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS
POR: _____ HORA: _____

ANEXO 7. Cuestionario para participantes

CHECK LIST PACIENTES CANDIDATOS A PROTOCOLO C71-18 Cohorte de investigación longitudinal para el estudio del VIH/SIDA Donación de imágenes por cápsula endoscópica.

A llenar por el entrevistador:

1. ¿Qué medicamentos ha utilizado en el último mes?

2. ¿Ha ingerido medicamentos con hierro en los últimos 10 días? No _____ Si _____

3. ¿Ha utilizado algún medicamento para el dolor o la fiebre como aspirina, naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, en las últimas tres semanas? No _____ Si _____
Especifique _____

4. ¿Ha utilizado algún medicamento para tratar infecciones en las últimas tres semanas? No _____ Si _____
Especifique _____

5. ¿Toma algún medicamento para dormir de manera cotidiana? No _____ Si _____
Especifique _____

6. ¿Se conoce alérgico a algún alimento o medicamento? No _____ Si _____
Especifique _____

7. ¿Lo han operado del abdomen o el tubo digestivo? No _____ Si _____
Especifique _____

8. Presenta alguna dificultad para deglutir o tragar? No _____ Si _____

9. Peso _____ Talla _____ IMC _____ ¿ El IMC es menor a 25? Si _____ No _____

10. Preferencia sexual. ¿HSH? Si _____ No _____

Día de la Cápsula:

¿Tiene Ayuno de al menos 8hrs?

Revisar en tiempo real a los 60 min de la ingesta

Iniciar Líquidos a las 2 horas de iniciado el estudio

Iniciar dieta blanda a las 4 horas.

Retiro de equipo: A las 8 horas

Recomendaciones post estudio

Human I-FABP

HK406

Edition 10-16

ELISA KIT

**PRODUCT INFORMATION &
MANUAL**

Read carefully prior to starting
procedures!

For use in laboratory
research only Not for
clinical or diagnostic use

Note that this user protocol is not lot-specific and is representative for the current specifications of this product. Please consult the vial label and the Certificate of Analysis for information on specific lots. Also note that shipping conditions may differ from storage conditions.

For research use only. Not for use in or on humans or animals or for diagnostics. It is the responsibility of the user to comply with all local/state and federal rules in the use of this product. Hycult Biotech is not responsible for any patent infringements that might result from the use or derivation of this product.

TABLE OF CONTENTS

	Page
1. Intended use	2
2. Introduction	2
3. Kit features.....	2
4. Protocol overview	3
5. Kit components and storage instructions	4
6. Warnings and precautions	5
7. Sample preparation	6
8. Reagent preparation	8
9. ELISA protocol	10
10. Interpretation of results.....	11
11. Technical hints	11
12. Quality control	12
13. Performance Characteristics.....	12
14. Troubleshooting.....	13
15. References	14

INTENDED USE

The human I-FABP ELISA kit is to be used for the *in vitro* quantitative determination of human I-FABP in serum, plasma, urine and cell culture supernatant samples. This kit is intended for laboratory research use only and is not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

The analysis should be performed by trained laboratory professionals.

INTRODUCTION

Fatty acid-binding proteins (FABPs) are a class of cytoplasmic proteins that bind long chain fatty acids. FABPs are small intracellular proteins (~13-14 kDa) with a high degree of tissue specificity. They are abundantly present in various cell types and play an important role in the intracellular utilization of fatty acids, transport and metabolism. There are at least nine distinct types of FABP, each showing a specific pattern of tissue expression. Due to its small size, FABP leaks rapidly out of ischemically damaged necrotic cells leading to a rise in serum levels. Ischemically damaged tissues are characterized histologically by absence (or low presence) of FABP facilitating recognition of such areas.

Intestinal FABP (I-FABP) is specifically localized in the epithelium cells of the small bowel. The I-FABP protein is derived from the human *FABP2* gene. Normally, I-FABP is undetectable in serum. Many observations indicate that I-FABP is a useful biochemical marker for intestinal cell damage both *in vivo* and *in vitro*. Ischemically damaged cells are characterized histologically by absence (or low presence) of FABP facilitating recognition of areas of ischemically damaged cells.

KIT FEATURES

- Working time of 3½ hours.
- Minimum concentration which can be measured is 47 pg/ml.
- Measurable concentration range of 47 to 3,000 pg/ml.
- Working volume of 100 µl/well.

Cross-reactivity

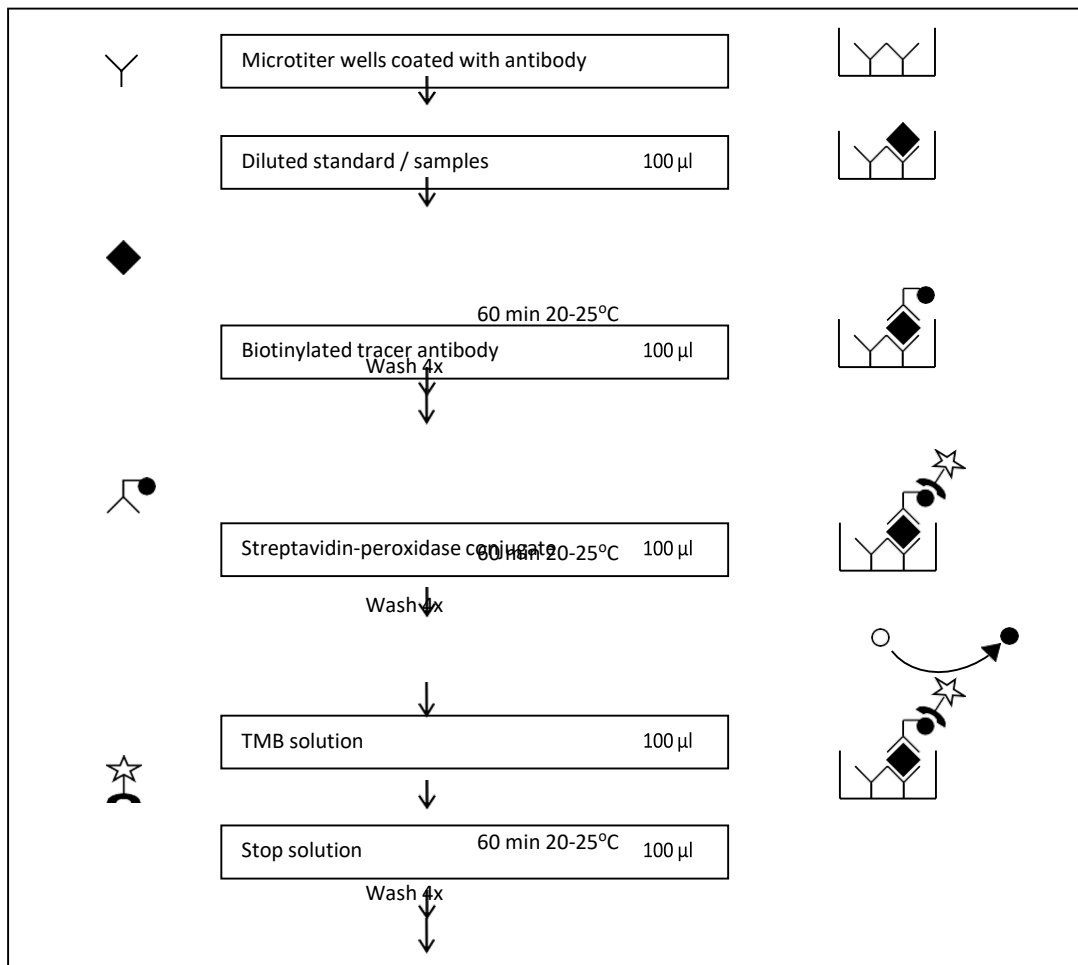
Potential cross-reacting proteins detected in the human I-FABP ELISA:

Cross reactant	Reactivity
Horse I-FABP	negative
Mouse I-FABP	average
Pig I-FABP	negative
Rat I-FABP	negative

Cross-reactivity for other species or proteins/peptides has not been tested.

Table 1

PROTOCOL OVERVIEW



- The human I-FABP ELISA is a ready-to-use solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay based on the sandwich principle with a working time of 3½ hours.
- The efficient format of a plate with twelve disposable 8-well strips allows free choice of batch size for the assay.
- Samples and standards are incubated in microtiter wells coated with antibodies recognizing human I-FABP.
- Biotinylated tracer antibody will bind to captured human I-FABP.
- Streptavidin-peroxidase conjugate will bind to the biotinylated tracer antibody.
- Streptavidin-peroxidase conjugate will react with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB).
- The enzyme reaction is stopped by the addition of oxalic acid.
- The absorbance at 450 nm is measured with a spectrophotometer. A standard curve is obtained by plotting the absorbance (linear) versus the corresponding concentrations of the human I-FABP standards (log).
- The human I-FABP concentration of samples, which are run concurrently with the standards, can be determined from the standard curve.

KIT COMPONENTS AND STORAGE INSTRUCTIONS

Kit component	Cat.#	Quantity HK406-01	Quantity HK406-02	Color code
Wash buffer 40x	WB01	1 vial (30 ml)	1 vial (30 ml)	Colorless
Sample Dilution buffer 10x	DB94	1 vial (15 ml)	1 vial (15 ml)	Blue
Dilution buffer 10x	DB93	1 vial (6 ml)	1 vial (6 ml)	Green
Standard		2 vials, lyophilized	4 vials, lyophilized	White
Tracer, biotinylated		1 vial, 1 ml lyophilized	2 vials, 1 ml lyophilized	White
Streptavidin-peroxidase 100x	CON03	1 tube, 0.25 ml in solution	1 tube, 0.25 ml in solution	Brown
TMB substrate	TMB050/TMB100	1 vial (11 ml)	1 vial (22 ml)	Brown
Stop solution	STOP110	1 vial (22 ml)	1 vial (22 ml)	Red
12 Microtiter strips, pre-coated		1 plate	2 plates	
Certificate of Analysis		1	1	
Manual		1	1	
Data collection sheet		2	2	

Table 2

- Upon receipt, store individual components at 2 - 8°C. Do not freeze.
- Do not use components beyond the expiration date printed on the kit label.
- The standard and tracer in lyophilized form and the streptavidin-peroxidase in concentrated solution are stable until the expiration date indicated on the kit label, if stored at 2 - 8°C.
- The exact amount of the standard is indicated on the label of the vial and the Certificate of Analysis.
- Once reconstituted the tracer is stable for 1 month if stored at 2 - 8°C.
- The streptavidin-peroxidase can only be stored in concentrated solution and is not stable when stored diluted.
- Upon receipt, foil pouch around the plate should be vacuum-sealed and unpunctured. Any irregularities to aforementioned conditions may influence plate performance in the assay.
- Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant pack and reseal along the entire edge of the zip-seal. Quality guaranteed for 1 month if stored at 2 - 8°C.

Materials required but not provided

- Calibrated micropipettes and disposable tips.
 - Distilled or de-ionized water.
 - Plate washer: automatic or manual.
 - Polypropylene tubes.
 - Calibrated ELISA plate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
 - Adhesive covers can be ordered separately. Please contact your local distributor.
- Centrifuge for 1 ml tubes

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For research use only, not for diagnostic or therapeutic use.
- This kit should only be used by qualified laboratory staff.
- Do not under any circumstances add sodium azide as preservative to any of the components.
- Do not use kit components beyond the expiration date.
- Do not mix reagents from different kits and lots. The reagents have been standardized as a unit for a given lot. Use only the reagents supplied by manufacturer.
- The assay has been optimized for the indicated standard range. Do not change the standard range.
- Open vials carefully: vials are under vacuum.
- It is advised to spin down streptavidin peroxidase tubes before use.
- Do not ingest any of the kit components.
- Kit reagents contain 2-chloroacetamide as a preservative. 2-Chloroacetamide is harmful in contact with skin and toxic if swallowed. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.
- The TMB substrate is light sensitive, keep away from bright light. The solution should be colorless until use.
- The stop solution contains 2% oxalic acid and can cause irritation or burns to respiratory system, skin and eyes. Direct contact with skin and eyes should be strictly avoided. If contact occurs, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
- Incubation times, incubation temperature and pipetting volumes other than those specified may give erroneous results.
- Do not reuse microwells or pour reagents back into their bottles once dispensed.
- Handle all biological samples as potentially hazardous and capable of transmitting diseases.
- Hemolyzed, hyperlipemic, heat-treated or contaminated samples may give erroneous results.
- Use polypropylene tubes for preparation of standard and samples. Do not use polystyrene tubes or sample plates.

SAMPLE PREPARATION

Collection, handling and storage Serum or plasma

Collect blood using normal aseptic techniques. If serum is used, separate serum from blood after clotting at room temperature within 1 hour by centrifugation (1500xg at 4°C for 15 min). Transfer the serum to a fresh polypropylene tube.

If plasma is used, separate plasma from blood within 20 minutes after blood sampling by centrifugation (1500xg at 4°C for 15 min). Transfer the plasma to a fresh polypropylene tube.

Most reliable results are obtained if citrate or heparin plasma is used.

Urine Collect urine using normal aseptic techniques. Centrifuge the urine to remove debris (1500xg at 4 °C for 15 min). Transfer urine to a fresh polypropylene tube.

Storage Store samples below -20°C, preferably at -70°C in polypropylene tubes. Storage at -20°C can affect recovery of human I-FABP. Use samples within 24 hours after thawing. Avoid multiple freeze-thaw cycles which may cause loss of human I-FABP activity and give erroneous results.

Do not use hemolyzed, hyperlipemic, heat-treated or contaminated samples.

Before performing the assay, samples should be brought to room temperature (18 – 25°C) and mixed gently. Prepare all samples (controls and test samples) prior to starting the assay procedure. Avoid foaming.

Dilution procedures Serum or plasma samples

Human I-FABP can be measured accurately if serum or plasma samples are diluted at least 2x before use with supplied sample dilution buffer in polypropylene tubes. Note that most reliable results are obtained with citrate or heparin plasma.

Urine samples

Human I-FABP can be measured accurately if urine samples are diluted at least 2x before use with supplied sample dilution buffer in polypropylene tubes. .

Remark regarding recommended sample dilution

The mentioned dilution for samples is a minimum dilution and should be used as a guideline. The recovery of human I-FABP from an undiluted sample is not 100% and may vary from sample to sample. When testing less diluted samples it is advisable to run recovery experiments to determine the influence of the matrix on the detection of human I-FABP.

Do not use polystyrene tubes or sample plates for preparation or dilution of the samples.

Guideline for dilution of samples

Please see the table 3 for recommended sample dilutions. Volumes are based on a total volume of at least 230 µl of diluted sample, which is sufficient for one sample in duplicate in the ELISA. For dilution of samples we recommend to use at least 10 µl of sample.

	Dilution	Pre-dilution	Amount of sample or pre-dilution required	Amount of Sample Dilution buffer required
1.	10x	Not necessary	25 µl (sample)	225 µl
2.	20x	Not necessary	15 µl (sample)	285 µl
3.	50x	Not necessary	10 µl (sample)	490 µl
4.	100x	Not necessary	10 µl (sample)	990 µl
5.	500x	Recommended: 10x (see nr.1)	10 µl (pre-dilution)	490 µl
6.	1000x	Recommended: 10x (see nr.1)	10 µl (pre-dilution)	990 µl
7.	2000x	Recommended: 20x (see nr.2)	10 µl (pre-dilution)	990 µl
8.	5000x	Recommended: 50x (see nr.3)	10 µl (pre-dilution)	990 µl

Table 3

REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to equilibrate to room temperature (20 – 25°C) prior to use. Return to proper storage conditions immediately after use.

Wash buffer

Prepare wash buffer by mixing 30 ml of 40x wash buffer with 1170 ml of distilled or de-ionized water, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of wash buffer by diluting 1 part of the 40x wash buffer with 39 parts of distilled or de-ionized water.

Sample Dilution buffer

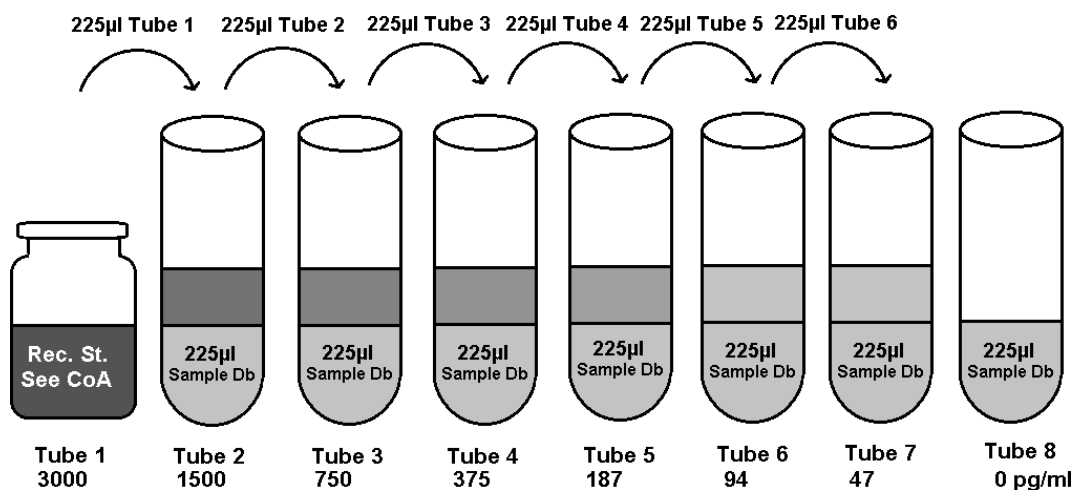
Prepare sample dilution buffer by mixing 15 ml of the 10x sample dilution buffer with 135 ml of distilled or de-ionized water, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of sample dilution buffer by diluting 1 part of the 10x dilution buffer with 9 parts of distilled or de-ionized water. Concentrated sample dilution buffer may contain crystals. In case the crystals do not disappear at room temperature within 1 hour, concentrated sample dilution buffer can be warmed up to 37°C. Do not shake the solution.

Dilution buffer

Prepare dilution buffer by mixing 6 ml of the 10x dilution buffer with 54 ml of distilled or de-ionized water, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of dilution buffer by diluting 1 part of the 10x dilution buffer with 9 parts of distilled or de-ionized water. Concentrated dilution buffer may contain crystals. In case the crystals do not disappear at room temperature within 1 hour, concentrated dilution buffer can be warmed up to 37°C. Do not shake the solution.

Standard solution

The standard is reconstituted by pipetting the amount of sample dilution buffer mentioned on the CoA in the standard vial. Use the standard vial as Tube 1 in Figure 1. Prepare each human I-FABP standard in polypropylene tubes by serial dilution of the reconstituted standard with sample dilution buffer as shown in Figure 1*. After reconstitution the standard



cannot be stored for repeated use. Figure 1

*) CoA: Certificate of Analysis, Rec. St: Reconstituted Standard, Sample Db: Sample dilution buffer

Tracer solution

The tracer is reconstituted by pipetting 1 ml distilled or de-ionized water. Dilute the reconstituted 1 ml tracer with 11 ml dilution buffer, which is sufficient for 1 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of tracer by diluting 1 part of the reconstituted tracer with 11 parts of dilution buffer.

Streptavidin-peroxidase solution

It is advised to spin down streptavidin-peroxidase tubes before use. Prepare the streptavidin-peroxidase solution by mixing 0.25 ml of the 100x streptavidin-peroxidase solution with

24.75 ml dilution buffer, which is sufficient for 2 x 96 tests. In case less volume is required, prepare the desired volume of streptavidin-peroxidase solution by diluting 1 part of the 100x streptavidin-peroxidase solution with 99 parts of dilution buffer.

ELISA PROTOCOL

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use.

1. Determine the number of test wells required, put the necessary microwell strips into the supplied frame, and fill out the data collection sheet. Return the unused strips to the storage bag with desiccant, seal and store at 2 - 8°C.
2. Transfer 100 µl in duplicate of standard, samples, or controls into appropriate wells. Do not touch the side or bottom of the wells.
3. Cover the tray and tap the tray to eliminate any air bubbles. Be careful not to splash liquid onto the cover.
4. Incubate the strips or plate for 1 hour at room temperature.
5. Wash the plates 4 times with wash buffer as follows*:
 - a. Carefully remove the plate sealer, avoid splashing.
 - b. Empty the plate by inverting plate and shaking contents out over the sink, keep inverted and tap dry on a thick layer of tissues.
 - c. Add 200 µl of wash buffer to each well, wait 20 seconds, empty the plate as described in 5b.
 - d. Repeat the washing procedure 5b/5c three times.
 - e. Empty the plate and gently tap on thick layer of tissues.
6. Add 100 µl of diluted tracer to each well using the same pipetting order as applied in step 2. Do not touch the side or bottom of the wells.
7. Cover the tray and incubate the tray for 1 hour at room temperature.
8. Repeat the wash procedure 4 times as described in step 5a-e.
9. Add 100 µl of diluted streptavidin-peroxidase to each well, using the same pipetting order as applied in step 2. Do not touch the side or bottom of the wells.
10. Cover the tray and incubate the tray for 1 hour at room temperature.
11. Repeat the wash procedure 4 times as described in step 5a-e.
12. Add 100 µl of TMB substrate to each well, using the same pipetting order as applied in step 2. Do not touch the side or bottom of the wells.
13. Cover the tray and incubate the tray for 30 minutes at room temperature. It is advised to control the reaction on the plate regularly. In case of strong development the TMB reaction can be stopped sooner. Avoid exposing the microwell strips to direct sunlight. Covering the plate with aluminium foil is recommended.
14. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution with the same sequence and timing as used in step 12. Mix solutions in the wells thoroughly by gently swirling the plate. Gently tap the tray to eliminate any air bubbles trapped in the wells.
15. Read the plate within 30 minutes after addition of stop solution at 450 nm using a plate reader, following the instructions provided by the instrument's manufacturer.

*) In case plate washer is used, please note: use of a plate washer can result in higher background and decrease in sensitivity. We advise validation of the plate washer with the manual procedure. Make sure the plate washer is used as specified for the manual method.

INTERPRETATION OF RESULTS

- Calculate the mean absorbance for each set of duplicate standards, control and samples.
- If individual absorbance values differ by more than 15% from the corresponding mean value, the result is considered suspect and the sample should be retested.
- The mean absorbance of the zero standard should be less than 0.4.
- Create a standard curve using computer software capable of generating a good curve fit. The mean absorbance for each standard concentration is plotted on the vertical (Y) axis versus the corresponding concentration on the horizontal (X) axis (logarithmic scale).
- If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.
- Samples that give a mean absorbance above the absorbance for the highest standard concentration are out of range of the assay. These samples should be retested at a higher dilution.

TECHNICAL HINTS

- User should be trained and familiar with ELISA assays and test procedure.
- If you are not familiar with the ELISA technique it is recommended to perform a pilot assay prior to evaluation of your samples. Perform the assay with a standard curve only following the instructions.
- Improper or insufficient washing at any stage of the procedure will result in either false positive or false negative results. Completely empty wells before dispensing wash buffer, fill with wash buffer as indicated for each cycle and do not allow wells to sit uncovered or dry for extended periods.
- Since exact conditions may vary from assay to assay, a standard curve must be established for every run. Samples should be referred to the standard curve prepared on the same plate.
- Do not mix reagents from different batches, or other reagents and strips. Remainders should not be mixed with contents of freshly opened vials.
- Each time the kit is used, fresh dilutions of standard, sample, tracer, streptavidin- peroxidase and buffers should be made.
- Caps and vials are not interchangeable. Caps should be replaced on the corresponding vials.
- To avoid cross-contaminations, change pipette tips between reagent additions of each standard, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- The waste disposal should be performed according to your laboratory regulations.

Technical support

Do not hesitate to contact our technical support team at support@hycultbiotech.com for inquiries and technical support regarding the human I-FABP ELISA.

Hycult Biotech, Frontstraat 2a, 5405 PB Uden, the Netherlands
T: +31 (0)413 251 335, F: +31 (0)413 248 353

QUALITY CONTROL

The Certificate of Analysis included in this kit is lot specific and is to be used to verify results obtained by your laboratory. The absorption values provided on the Certificate of Analysis are to be used as a guideline only. The results obtained by your laboratory may differ.

This assay is designed to eliminate interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Hycult Biotech immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

For optimal performance of this kit, it is advised to work according to good laboratory practice.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Automated ELISA performance

The human I-FABP ELISA has been validated on the Dynex DSX automated system. The ELISA has been performed according to the protocol mentioned in chapter 9 with exception of the washing protocol. For washing the following protocol has been used:

1. Add 300 µl of wash buffer to each well, wait at least 20 seconds, empty the plate.
2. Repeat the washing procedure 4 times.

Results were similar to the manual method. If another automated system or plate washer is used, we advise to consider possible adjustments and optimization in washing protocol.

Precision and reproducibility

The intra-assay precision and reproducibility was determined with four plasma samples that were tested in duplicate.

Plasma sample (n=4)	I-FABP pg/ml	CV %
S1	825	3.2
S2	360	3.2
S3	809	6.6
S4	557	5.4

To determine the inter-assay variation, four identical plasma samples were tested on two plates by two different operators.

Plasma sample (n=4)	I-FABP pg/ml (min-max)	CV %
S1	424 (423-424)	0.2
S2	477 (476-478)	0.3
S3	224 (221-227)	1.9
S4	430 (425-435)	1.6

To determine batch-to-batch variation, four different internally validated plasma samples have been applied in plates of five different batches and used as an internal control.

Plasma sample (n=4)	I-FABP pg/ml (min-max)	CV %
S1	954 (896-1,036)	5.4
S2	529 (494-568)	5.7
S3	959 (931-981)	2.2
S4	689 (664-719)	3.1

TROUBLESHOOTING

Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged before expiry date of the product. A written complaint containing lot number of the product and experimental data should be sent to support@hycultbiotech.com.

Suggestions summarized below in table 7 can be used as a guideline in the case of unexpected assay results.

Low absorbance	High absorbance	Poor duplicates	All wells positive	All wells negative	Possible cause
•	•		•	•	Kit materials or reagents are contaminated or expired
•					Incorrect reagents used
•		•	•		Lyophilized reagents are not properly reconstituted
•	•	•	•	•	Incorrect dilutions or pipetting errors
•		•			Improper plastics used for preparation of standard and/or samples
•	•				Improper incubation times or temperature
		•			Especially in case of 37°C incubation: plates are not incubated uniformly
•					Assay performed before reagents were brought to room temperature
•	•	•	•	•	Procedure not followed correctly
				•	Omission of a reagent or a step
		•			Poor mixing of samples
	•		•		Low purity of water
	•	•			Strips were kept dry for too long during/after washing
	•	•	•		Inefficient washing
	•	•			Cross-contamination from other samples or positive control
		•	•		TMB solution is not clear or colorless
•	•				Wrong filter in the microtiter reader
	•	•			Airbubbles
		•			Imprecise sealing of the plate after use
•					Wrong storage conditions
•					Lamp in microplate reader is not functioning optimally

Table 7

REFERENCES

1. Pelsers, M et al; Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* 2003, **36**: 529
2. Block, T et al; Diagnostic accuracy of plasma biomarkers for intestinal ischaemia. *ScandJ Clin Lab Invest* 2008, **68**: 242
3. Derikx, J et al; A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol* 2009, **43**: 727
4. Matthijsen, R et al; Enterocyte shedding and epithelial lining repair following ischemia of the human small intestine attenuate inflammation. *PLoS One* 2009, **4**: e7045
5. Grootjans, J et al; Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol* 2010, **176**: 2283
6. Thuijls, G et al; Non-invasive markers for early diagnosis and determination of the severity of necrotizing enterocolitis. *Ann Surg* 2010, **251**: 1174
7. Wijck, van, K et al; Exercise-induced splanchnic hypoperfusion results in gut dysfunction in healthy men. *PLoS One* 2011, **6**: e22366
8. Chevalier, M et al; The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation. *PLoS Pathog* 2013, **9**: e1003453
9. French, A et al; Microbial translocation and liver disease progression in women coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2013, **208**: 679
10. Prendergast, A et al; Stunting is characterized by chronic inflammation in Zimbabwean infants. *PLoS One* 2014, **9**: e86928

Quantikine® ELISA

Human CD14 Immunoassay

Catalog Number DC140

For the quantitative determination of human CD14 concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	2
TECHNICAL HINTS	2
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS.....	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED.....	3
PRECAUTIONS.....	4
SAMPLE COLLECTION & STORAGE.....	4
SAMPLE PREPARATION	4
REAGENT PREPARATION.....	5
ASSAY PROCEDURE	6
CALCULATION OF RESULTS	7
TYPICAL DATA	7
PRECISION	8
RECOVERY.....	8
SENSITIVITY.....	8
LINEARITY	9
CALIBRATION	9
SAMPLE VALUES.....	9
SPECIFICITY.....	10
REFERENCES	11
PLATE LAYOUT	12

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA

TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400

E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UKTEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420

E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050 TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001

E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

CD14 is a glycoprotein that mediates the interaction of lipopolysaccharide (LPS, endotoxin) with cells, thereby signaling the presence of gram-negative bacteria (1-3). CD14 is either soluble (CD14) (4, 5) or membrane-bound (mCD14) by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (6, 7). mCD14 is a 55 kDa glycoprotein (1), while CD14 varies from about 43 to 53 kDa, depending on the degree of glycosylation and whether it was synthesized without the anchor or was shed by phospholipase cleavage of the anchor or by proteolysis (12-14). There is no evidence for different mRNAs for m- and CD14. There is no apparent sequence homology with other proteins. The sequence of human CD14 is 63-73% identical to that of mouse, rat, or rabbit CD14 (15).

mCD14 is expressed primarily on myeloid cells, such as monocytes, macrophages and neutrophils (1-3), the cells most sensitive to LPS, and to a lesser extent on other cells, such as B cells (8) and a circulating dendritic cell progenitor (9). CD14 appears to mediate LPS stimulation of cells that do not express mCD14 (10, 11), such as endothelial, epithelial and smooth-muscle cells. CD14 is found in both serum and urine (5).

The binding of LPS to CD14 requires an acute phase protein, LPS-binding protein (LBP) (16). The relationship of mCD14, CD14, LPS and LBP is complicated. At low concentrations of LPS, LBP is essential for the binding of LPS to CD14, but at high concentrations, LBP may actually inhibit binding of LPS to CD14. In addition, CD14 may compete with mCD14 for LPS (17) and may serve to help clear LPS (18). These four factors thus appear to participate in a complex feedback mechanism of immune regulation involving both up-regulation and down-regulation of the inflammatory process triggered by LPS. It is loss of control of this mechanism that appears to lead to septic shock. LPS-bound CD14 signals production of inflammatory cytokines and other inflammatory proteins, but the mechanism of signal transduction is unclear. Since

a GPI anchor is not transmembrane, there presumably is another transmembrane protein on cells through which LPS-bound CD14 transmits a signal (19).

In addition to its well known role in gram-negative infections, CD14 likely serves other functions as well. It recognizes soluble peptidylglycan from gram-positive cell walls (20), and it has been reported to bind apoptotic cells and induce their phagocytosis (21).

The Quantikine® Human CD14 Immunoassay is a 4.5 hour solid phase ELISA designed to measure human CD14 in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains CHO

cell-expressed recombinant human CD14 and antibodies raised against the recombinant factor. This immunoassay has been shown to accurately quantitate the recombinant factor. Results obtained measuring natural human CD14 showed dose-response curves that were parallel to the standard curves obtained using the Quantikine® kit standards. These results indicate that this kit can be used to determine relative mass values for human CD14.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for human CD14 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any CD14 present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for human CD14 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of CD14 bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, further dilute the samples with calibrator diluent and repeat the assay.
- Any variation in diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- This assay is designed to eliminate interference by other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine® Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of Wash Buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.
- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human CD14 Microplate	890639	96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody specific for human CD14.	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human CD14 Conjugate	890640	21 mL of a polyclonal antibody specific for human CD14 conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human CD14 Standard	890641	Recombinant human CD14 in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. <i>Refer to the vial label for reconstitution volume.</i>	
Assay Diluent RD1W	895117	11 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Calibrator Diluent RD5P Concentrate	895151	2 vials (21 mL/vial) of a concentrated buffered protein base with preservatives. <i>Use diluted 1:5 in this assay.</i>	
Wash Buffer Concentrate	895003	21 mL of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	12 mL of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	12 mL of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895032	6 mL of 2 N sulfuric acid.	
Plate Sealers	N/A	4 adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- 100 mL and 500 mL graduated cylinders.
- Test tubes for dilution of standards and samples.
- Human CD14 Controls (optional; R&D Systems®, Catalog # QC20).

PRECAUTIONS

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution.

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Color Reagent B may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Refer to the MSDS on our website prior to use.

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifugation for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA, citrate, or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma samples require at least a 200-fold dilution prior to assay. A suggested 200-fold dilution is 10 μ L sample + 1990 μ L Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5)*.

Cell culture supernate samples may require dilution.

*See Reagent Preparation section

CALCULATION OF RESULTS

Bring all reagents to room temperature before use.

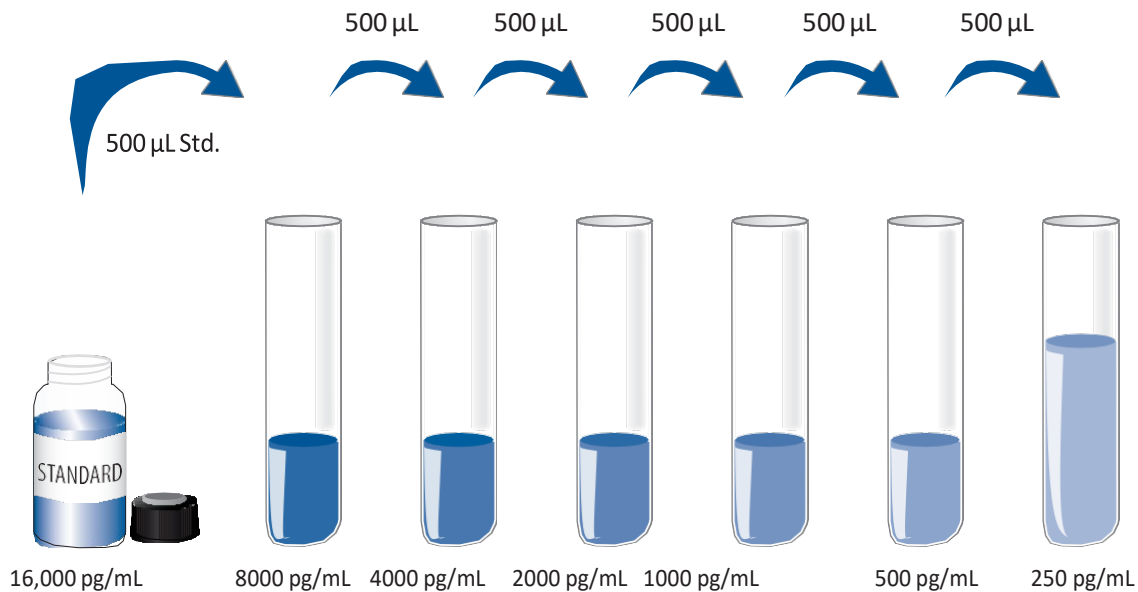
Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 200 μL of the resultant mixture is required per well.

Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5) - Add 20 mL of Calibrator Diluent RD5P Concentrate to 80 mL of deionized or distilled water to prepare 100 mL of Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5).

Human CD14 Standard - Refer to the vial label for reconstitution volume.- Reconstitute the Human CD14 Standard with Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5). This reconstitution produces a stock solution of 16,000 pg/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 500 μL of Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5) into each tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted Human CD14 Standard (16,000 pg/mL) serves as the high standard. Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5) serves as the zero standard (0 pg/mL).



CALCULATION OF RESULTS

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples, standards, and controls be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 100 μL of Assay Diluent RD1W to each well.
4. Add 100 μL of standard, control, or sample* per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 3 hours at room temperature. A plate layout is provided as a record of samples and standards assayed.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of four washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 200 μL of Human CD14 Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 200 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature. **Protect from light.**
9. Add 50 μL of Stop Solution to each well. The color in the wells should change from blue to yellow. If the color in the wells is green or the color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

*Samples may require dilution. See Sample Preparation section.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by

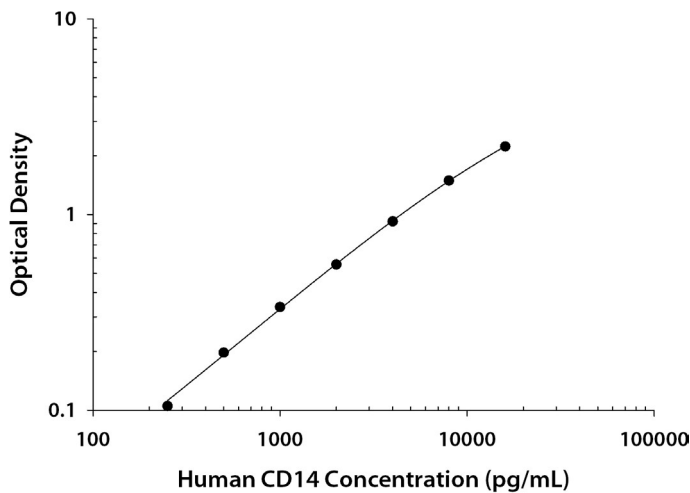
plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized

by plotting the log of the human CD14 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.037 0.043	0.040	—
250	0.145 0.145	0.145	0.105
500	0.238 0.236	0.237	0.197
1000	0.379 0.375	0.377	0.337
2000	0.597 0.595	0.596	0.556
4000	0.965 0.958	0.962	0.922
8000	1.530 1.530	1.530	1.490
16,000	2.275 <u>2.262</u>	2.268	2.228

Intra-assay Precision (Precision within an assay)

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-assay Precision (Precision between assays)

Three samples of known concentration were tested in forty separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of components.

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Mean (pg/mL)	1111	2158	4187	1159	2298	4346
Standard deviation	71	104	216	86	153	209
CV (%)	6.4	4.8	5.2	7.4	6.7	4.8

RECOVERY

The recovery of human CD14 spiked to three different levels in samples throughout the range of the assay in various matrices was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture media (n=5)	91	85-105%
Serum* (n=5)	98	84-107%
EDTA plasma* (n=5)	98	90-107%
Heparin plasma* (n=5)	96	91-104%
Citrate plasma* (n=5)	102	88-110%

*Samples were first diluted 1:400 and then spiked.

SENSITIVITY

The minimum detectable dose (MDD) of human CD14 is typically less than 125 pg/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

To assess the linearity of the assay, samples containing or spiked with high concentrations of human CD14 were diluted with calibrator diluent to produce samples with values within the dynamic range of the assay.

		Cell culture media (n=5)	Serum*(n=5)	EDTA plasma* (n=5)	Heparin plasma* (n=5)	Citrate plasma* (n=5)
1:2	Average % of Expected	98	100	100	97	106
	Range (%)	91-102	99-102	97-102	89-110	104-109
1:4	Average % of Expected	99	107	99	100	109
	Range (%)	91-104	103-116	96-103	95-114	105-118
1:8	Average % of Expected	99	109	100	99	110
	Range (%)	87-107	104-118	95-109	90-105	103-118
1:16	Average % of Expected	96	103	98	102	105
	Range (%)	87-105	96-116	90-111	88-111	97-111

*Samples were diluted as directed in the Sample Preparation section.

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified CHO cell-expressed recombinant human CD14 produced at R&D Systems®.

SAMPLE VALUES

Serum/Plasma - Samples from apparently healthy volunteers were evaluated for the presence of human CD14 in this assay. No medical histories were available for the donors used in this study.

Sample Type	Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)
Serum (n=66)	1900	800-3200
EDTA plasma (n=34)	1800	1200-2600
Heparin plasma (n=34)	1900	1200-3100
Citrate plasma (n=34)	2000	1500-3000

Cell Culture Supernates - Human peripheral blood mononuclear cells (5×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 μ M β -mercaptoethanol,

2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin sulfate. The cells were cultured unstimulated or stimulated with 10 μ g/mL PHA. Aliquots of the cell culture supernates were removed on days 1, 3, and 5 and assayed for levels of human CD14.

Sample Type	Day 1 (pg/mL)	Day 3 (pg/mL)	Day 5 (pg/mL)
Unstimulated	5070	9457	7762
Stimulated	12,287	22,343	24,720

This assay recognizes natural and recombinant human CD14.

Lipopolysaccharide was prepared at 1.0 µg/mL, mouse CD14 was prepared at 50 ng/mL, and the other factors listed below were prepared at 160 ng/mL in calibrator diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors prepared as described above in a

mid-range recombinant human CD14 control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Recombinant human:

ANG AR IL-6 RIL-7 IL-8 IL-9
 CNTF IL-10 IL-11 IL-12 IL-13
 β-ECGF EGF KGF
 Epo LAP (TGF-β1) LIF
 FGF acidic FGF M-CSF MCP-1 MIP-1α
 basic FGF-4 MIP-1β β-NGF FOSM
 FGF-5 FGF-6 PD-ECGF PDGF-AA PDGF-
 G-CSF GM-CSF AB PDGF-BB PTN
 CSF RANTES SCF
 gp130 GROα SLPI TGF-α TGF-β1
 GROβ GROγ TGF-β2 TGF-β3
 HB-EGF HGF TGF-β RI TNF-α TNF-β
 IFN-γ IGF-I TNF RI TNF RII VEGF
 IGF-II

IL-1α IL-1β

IL-1ra IL-1 RI

IL-1 RII IL-2

IL-2 Rα IL-3

IL-3 Rα IL-4

IL-4 RIL-5

IL-5 Rβ IL-6

Recombinant mouse:

CD14

CD14/Fc

Chimera

GM-CSF

IL-1α IL-1β IL-3 IL-4 IL-5

IL-5 Rα IL-6

IL-7 IL-9 IL-10 IL-13 LIF

MIP-1α MIP-1β SCF TNF-α

Recombinant amphibian:

TGF-β5

Natural

proteins:

bovine FGF

acidic bovine

FGF basic

human

PDGF

porcine

PDGF

human TGF-

β1 porcine

TGF-β1

Other:

Lipopolysaccharide

1. Wright, S.D. *et al.* (1990) *Science* **249**:1431.
2. Schumann, R.R. (1992) *Res. Immunol.* **143**:11.
3. Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias (1995) *Annu. Rev. Immunol.* **13**:437.
4. Bazil, V. *et al.* (1986) *Eur. J. Immunol.* **16**:1583.
5. Bazil, V. *et al.* (1989) *Mol. Immunol.* **26**:657.
6. Simmons, D.L. *et al.* (1989) *Blood* **73**:284.
7. Haziot, A. *et al.* (1988) *J. Immunol.* **141**:547.
8. Ziegler-Heitbrock, H.W.L. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**:1937.
9. Ferrero, E. *et al.* (1998) *J. Immunol.* **160**:2675.10.
- Frey, E.A. *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* **176**:1655.
11. Pugin, J. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2744.
12. Durieux, J.J. *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**:2006.
13. Bufler, P. *et al.* (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**:604.
14. Stelter, F. *et al.* (1996) *Eur. J. Biochem.* **236**:457.
15. Takai, N. *et al.* (1997) *J. Leukoc. Biol.* **61**:736.
16. Schumann, R.R. *et al.* (1990) *Science* **249**:1429.
17. Grunwald, U. *et al.* (1993) *Circul. Shock* **39**:220.
18. Tapping, R.I. and P.S. Tobias (1997) *J. Biol. Chem.* **272**:23157.19. Vita, N. *et al.* (1997) *J. Immunol.* **158**:3457.
20. Weidemann, B. *et al.* (1997) *Infect. Immun.* **65**:858.
21. Devitt, A. *et al.* (1998) *Nature* **392**:505.

Use this plate layout to record standards and samples assayed.

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

All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

©2017 R&D Systems[®], Inc.

08.98

750331.8

5/17

Quantikine® ELISA

Human CD163 Immunoassay

Catalog Number DC1630

For the quantitative determination of human CD163 concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	2
TECHNICAL HINTS	2
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED	3
PRECAUTIONS.....	4
SAMPLE COLLECTION & STORAGE	4
SAMPLE PREPARATION	4
REAGENT PREPARATION	5
ASSAY PROCEDURE	6
CALCULATION OF RESULTS	7
TYPICAL DATA	7
PRECISION	8
RECOVERY	8
LINEARITY	8
SENSITIVITY	9
CALIBRATION	9
SAMPLE VALUES.....	9
SPECIFICITY	10
REFERENCES	10

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA

TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400

E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420

E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050 TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001

E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

INTRODUCTION

CD163, previously called M130 or p155, is a 130 kDa type I transmembrane protein belonging to group B of the cysteine-rich scavenger receptor family (1-3). It is essential for clearance of hemoglobin-haptoglobin (Hb-Hp) complexes in the liver, spleen, and in circulation (4).

Expression of CD163 is constitutive and/or induced by glucocorticoids, IL-10, IL-6, or endotoxin, on circulating monocytes, most tissue macrophages, and at low levels on monocyte-derived dendritic cells (1, 2, 5, 6). It is not present on macrophages in the mantle zone and germinal centers of lymphoid follicles, interdigitating reticulum cells, or Langerhans cells (6). The 1009 amino acid (aa) extracellular domain of CD163 contains 9 scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains (1). The third SRCR domain is crucial for calcium-dependent binding of hemoglobin/haptoglobin complexes (3). Four isoforms vary in both intracellular and extracellular regions (1, 7). The C-terminal 42 aa of the 84 aa cytoplasmic domain are substituted with 48 alternate aa in isoform 2 and by 6 alternate aa in isoforms 3 and 4. Isoform 4 also has a 34 aa insert between SRCR domains 5 and 6. While all are expressed, isoform 3 is most abundant, most expressed on the cell surface, and most active in endocytosis (7). An approximately 130 kDa soluble form of human CD163 (sCD163) is assumed to contain virtually all of the extracellular domain. It shares approximately 75% aa sequence identity with mouse and rat sCD163 (8, 9). It is released from the cell surface by proteolysis after oxidative stress or inflammatory stimuli, including bacterial endotoxins and activation of the Toll-like receptors TLR2 or TLR5 (9-12).

Circulating free hemoglobin (Hb) is highly toxic due to the redox-reactive iron it contains. Iron is also a limiting nutrient for pathogen growth (11). When present in the circulation, free Hb is quickly complexed with haptoglobin (Hp). The complexes are then cleared by CD163, which is their only known receptor (4). Of haptoglobin isotypes, the 2-2 dimer has higher affinity for CD163 than the 1-1 dimer (4). CD163 will also take up free Hb at low affinity if Hp is depleted or overwhelmed (13). CD163-mediated uptake of Hb-Hp induces a signaling cascade resulting in upregulation of heme oxygenase-1 (HO-1), a critical enzyme for recycling of heme iron (14, 15). Soluble CD163 (sCD163) also has a protective and anti-inflammatory role, as shown by its ability to inhibit phorbol ester-induced lymphocyte proliferation (16). In addition to Hb-Hp, monocyte CD163 can bind the TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), which may serve to sequester TWEAK from its primary receptor, Fn14/TWEAK R (17). The second SRCR of CD163 on bone marrow macrophages has an additional function, acting as an erythroblast adhesion receptor that enhances erythropoiesis (18). Some inflammatory conditions are associated with dysregulation of CD163 or of its shedding (19-22). Decreased production of cellular CD163 within atherosclerotic plaques and increased circulating sCD163 may occur in diabetes mellitus (19). Elevated sCD163 has also been reported in multiple sclerosis and liver failure, and in the synovial fluid in spondyloarthritis but not rheumatoid arthritis (20-22).

The Quantikine® Human CD163 immunoassay is a 4.5 hour solid phase ELISA designed to measure human soluble CD163 in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains NS0-expressed recombinant human CD163 and has been shown to accurately quantitate recombinant factor. Results obtained using natural human CD163 showed linear curves that were parallel to the standard curves obtained using the Quantikine® kit standards. These results indicate that this kit can be used to determine relative mass values for human CD163.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for human CD163 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any CD163 present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked monoclonal antibody specific for human CD163 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of CD163 bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, further dilute the samples with calibrator diluent and repeat the assay.
- Any variation in diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- This assay is designed to eliminate interference by other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine® Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of Wash Buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.
- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human CD163 Microplate	893269	96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody specific for human CD163.	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human CD163 Standard	893271	Recombinant human CD163 in a buffered protein solution with preservatives; lyophilized. <i>Refer to the vial label for reconstitution volume.</i>	Aliquot and store at ≤ -20 °C in a manual defrost freezer.* Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Human CD163 Conjugate	893270	21 mL of a monoclonal antibody specific for human CD163 conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Assay Diluent RD1-34	895265	11 mL of a buffered protein base with preservatives.	
Calibrator Diluent RD5-24	895325	21 mL of a concentrated buffered protein base with preservatives. <i>Use diluted 1:2 in this assay.</i>	
Wash Buffer Concentrate	895003	21 mL of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	12 mL of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	12 mL of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895032	6 mL of 2 N sulfuric acid.	
Plate Sealers	N/A	4 adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- 50 mL and 500 mL graduated cylinders.
- Test tubes for dilution of standards and samples.
- Human CD163 Controls (optional; R&D Systems®, Catalog # QC61).

PRECAUTIONS

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution.

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Color Reagent B may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Refer to the MSDS on our website prior to use.

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifugation for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note: *EDTA plasma is not suitable for use in this assay due to its chelating properties.*

Citrate plasma has not been validated for use in this assay. Hemolyzed samples are not suitable for use in this assay.

SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma samples require a 10-fold dilution. A suggested 10-fold dilution is 20 μL of sample + 180 μL of Calibrator Diluent RD5-24 (diluted 1:2)*.

*See Reagent Preparation section.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

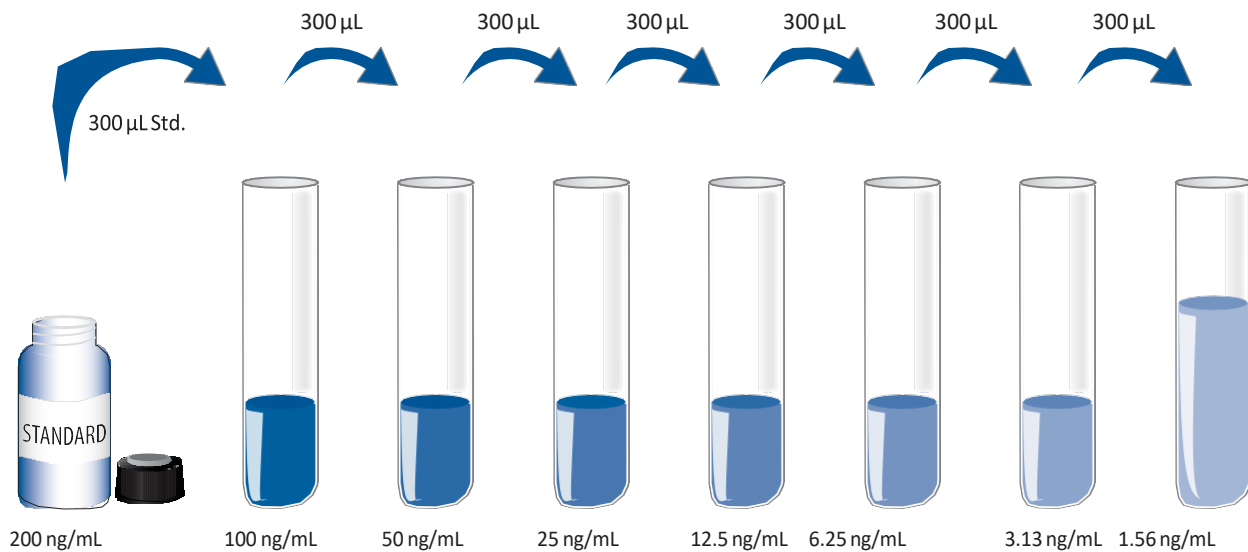
Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 200 μ L of the resultant mixture is required per well.

Calibrator Diluent RD5-24 (diluted 1:2) - Add 20 mL of Calibrator Diluent RD5-24 to 20 mL of deionized or distilled water to prepare 40 mL of Calibrator Diluent RD5-24 (diluted 1:2).

Human CD163 Standard - Refer to the vial label for reconstitution volume. Reconstitute the Human CD163 Standard with deionized or distilled water. This reconstitution produces a stock solution of 200 ng/mL. Mix the standard to ensure complete reconstitution and allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 300 μ L of Calibrator Diluent RD5-24 (diluted 1:2) into the 100 ng/mL tube. Pipette 300 μ L into the remaining tubes. Use the stock solution to produce a dilution series (below).

Mix each tube thoroughly before the next transfer. The 100 ng/mL standard serves as the high standard. Calibrator Diluent RD5-24 (diluted 1:2) serves as the zero standard (0 ng/mL).



ASSAYPROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all standards, samples, and controls be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 100 μL of Assay Diluent RD1-34 to each well.
4. Add 50 μL of standard, control, or sample* per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of four washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 200 μL of Human CD163 Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 200 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature. **Protect from light.**
9. Add 50 μL of Stop Solution to each well. The color in the wells should change from blue to yellow. If the color in the wells is green or the color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

*Samples may require dilution. See the Sample Preparation section.

CALCULATION OF RESULTS

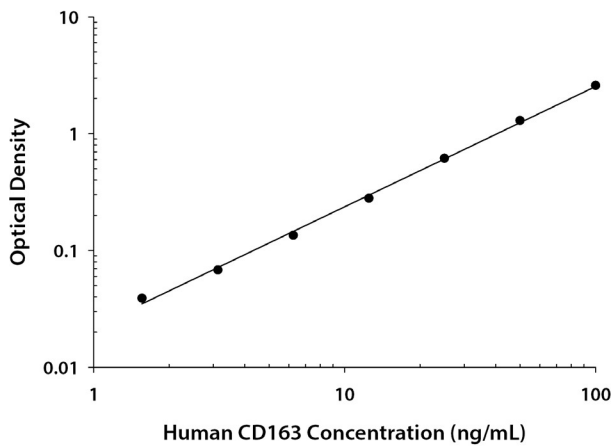
Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a log/log curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on a log/log graph. The data may be linearized by plotting the log of the human CD163 concentrations versus the log of the O.D. on a linear scale, and the best fit line can be determined by regression analysis.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



(ng/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.011 0.011	0.011	—
1.56	0.039 0.039	0.039	0.028
3.13	0.066 0.069	0.068	0.057
6.25	0.134 0.135	0.135	0.124
12.5	0.276 0.284	0.280	0.269
25	0.608 0.622	0.615	0.604
50	1.261 1.330	1.296	1.285
100	2.585 <u>2.587</u>	2.586	2.575

PRECISION

Intra-assay Precision (Precision within an assay)

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-assay Precision (Precision between assays)

Three samples of known concentration were tested in forty separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of components.

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Mean (ng/mL)	20.0	35.1	65.6	20.0	34.9	63.6
Standard deviation	0.75	1.2	2.3	1.3	1.6	2.6
CV (%)	3.8	3.4	3.5	6.5	4.6	4.1

RECOVERY

The recovery of human CD163 spiked to levels throughout the range of the assay was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture media (n=4)	107	101-110%

LINEARITY

To assess the linearity of the assay, samples containing and/or spiked with high concentrations of human CD163 were serially diluted with the calibrator diluent to produce samples with values within the dynamic range of the assay.

		Cell culture media (n=4)	Serum*(n=4)	Heparin plasma* (n=4)
1:2	Average % of Expected	102	109	109
	Range (%)	98-105	105-113	105-116
1:4	Average % of Expected	100	104	101
	Range (%)	98-103	100-109	94-111
1:8	Average % of Expected	100	95	96
	Range (%)	96-103	90-100	92-104
1:16	Average % of Expected	97	88	90
	Range (%)	93-101	87-89	84-104

*Samples were diluted prior to assay as directed in the Sample Preparation section.

SENSITIVITY

Forty-six assays were evaluated and the minimum detectable dose (MDD) of human CD163 ranged from 0.058-0.613 ng/mL. The mean MDD was 0.177 ng/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. value of twenty-zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified NS0-expressed recombinant human CD163 produced at R&D Systems.

SAMPLE VALUES

Serum/Plasma - Samples from apparently healthy volunteers were evaluated for the presence of human CD163 in this assay. No medical histories were available for the donors used in this study.

Sample Type	Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)	Standard Deviation (ng/mL)
Serum (n=36)	472	88-902	186
Heparin plasma (n=36)	521	186-996	203

Cell Culture Supernates:

PBLs human peripheral blood lymphocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 5 μ M β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL of penicillin, and 100 μ g/mL of streptomycin sulfate. Cells were cultured unstimulated or stimulated with 10 μ g/mL of PHA. Aliquots of the cell culture supernates were removed and assayed for levels of human CD163.

Condition	Day 1 (ng/mL)	Day 6 (ng/mL)
Unstimulated	ND	5.0
Stimulated	ND	4.4

ND=Non detectable

Human monocytes were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin sulfate, 10 ng/mL of recombinant human IFN- γ , 7.0 ng/mL of recombinant human IL-10, and 5.0 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS). An aliquot of the cell culture supernate was removed, assayed for human CD163, and measured 64.9 ng/mL.

Human monocytes were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and 25 ng/mL of recombinant human GM-CSF. In the last 24 hours, they were stimulated with 50 ng/mL of LPS. An aliquot of the cell culture supernate was removed, assayed for

human CD163, and measured 20.3 ng/mL.

SPECIFICITY

This assay recognizes natural and recombinant human CD163.

The factors listed below were prepared at 1000 ng/mL in calibrator diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 1000 ng/mL in a mid-range recombinant human CD163 control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Recombinant human:

CD5 CD6
DMBT1
TWEAK

Recombinant mouse:

CD5 CD6
TWEAK

REFERENCES

1. Law, S.K.A. *et al.* (1993) Eur. J. Immunol. **23**:2320.
2. Sulahian, T.H. *et al.* (2000) Cytokine **12**:1312.
3. Madsen, M. *et al.* (2004) J. Biol. Chem. **279**:51561.
4. Kristiansen, M. *et al.* (2001) Nature **409**:198.
5. Buechler, C. *et al.* (2000) J. Leuk. Biol. **67**:97.
6. Pulford, K.A. *et al.* (1989) J. Clin. Pathol. **42**:414.
7. Nielsen, M.J. *et al.* (2006) J. Leukoc. Biol. **79**:837.
8. Moller, H.J. *et al.* (2002) Blood **99**:378.
9. Droste, A. *et al.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Comm. **256**:110.
10. Hintz, K.A. *et al.* (2002) J. Leukoc. Biol. **72**:711.
11. Weaver, L.K. *et al.* (2006) J. Leukoc. Biol. **80**:26.
12. Timmerman, M. and P.Hogger (2005) Free Radic. Biol. Med. **39**:98.
13. Schaer, D.J. *et al.* (2006) Blood **107**:373.
14. Schaer, C.A. *et al.* (2006) Circ. Res. **99**:943.
15. Schaer, C.A. *et al.* (2007) J. Leukoc. Biol. **82**:106.
16. Hogger, P. and C. Sorg (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. **288**:841.17. Bover, L.C. *et al.* (2007) J. Immunol. **178**:8183.
18. Fabriek, B.O. *et al.* (2007) Blood **109**:5223.19. Levy, A.P. *et al.* (2007) Circ. Res. **101**:106.
20. Fabriek, B.O. *et al.* (2007) J. Neuroimmunol. **187**:179.
21. Moller, H.J. *et al.* (2007) J. Hepatol. **47**:671.
22. Baeten, D. *et al.* (2004) Arthritis Rheum. **50**:1611.

All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

©2017 R&D Systems®, Inc.

Quantikine® ELISA

Human C-Reactive Protein/CRP Immunoassay

Catalog Number DCRP00

SCRPO0

PDCRP00

For the quantitative determination of human C-Reactive Protein (CRP) concentrations in cellculture supernates, serum, and plasma.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	1
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	2
TECHNICAL HINTS	2
PRECAUTIONS	2
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	3
PHARMPAK CONTENTS	4
OTHER SUPPLIES REQUIRED	5
SAMPLE COLLECTION & STORAGE	5
SAMPLE PREPARATION	5
REAGENT PREPARATION	6
ASSAY PROCEDURE	7
CALCULATION OF RESULTS	8
TYPICAL DATA	8
PRECISION	9
RECOVERY	9
LINEARITY	9
SENSITIVITY	10
CALIBRATION	10
SAMPLE VALUES	10
SPECIFICITY	11
REFERENCES	12
PLATE LAYOUT	13

Manufactured and Distributed by:

USA R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413

TEL: 800 343 7475 612 379 2956

FAX: 612 656 4400

E-MAIL: info@bio-techne.com

Distributed by:

Europe | Middle East | Africa Bio-Techne Ltd. 19 Barton Lane,
Abingdon Science Park Abingdon OX14 3NB, UK

TEL: +44 (0)1235 529449

FAX: +44 (0)1235 533420

E-MAIL: info.emea@bio-techne.com

China Bio-Techne China Co., Ltd.

Unit 1901, Tower 3, Raffles City Changning Office, 1193 Changning Road,
Shanghai PRC 200051

TEL: +86 (21) 52380373 (400) 821-3475

FAX: +86 (21) 52371001

E-MAIL: info.cn@bio-techne.com

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

C-Reactive Protein (CRP), also known as Pentraxin 1, is a non-glycosylated protein in the Pentraxin family that also includes Pentraxin 2/SAP and Pentraxin 3/TSG-14. CRP functions as a sensor and activator of the innate immune response (1). In humans, it is a major acute-phase protein; its circulating concentration is dramatically elevated at the onset of inflammation (2). In mice, however, serum CRP levels increase only slightly during inflammation, and the analogous acute phase role is filled by Pentraxin 2 (3). CRP assembles non-covalently into a 110-120 kDa cyclical pentamer (4). Mature human CRP shares 71% and 64% amino acid (aa) sequence identity with mouse and rat CRP, respectively (5).

CRP binds and opsonizes apoptotic cells (6-8) as well as bacteria such as *S. pneumoniae* (9, 10). It subsequently enhances the phagocytosis of these opsonized cells (6, 8-10). CRP additionally binds several proteins in the complement cascade including C1q, C4BP, and Factor H (8, 11-13). It enhances activation of the classical complement pathway and the deposition of C3b (9). In later stages of the response, CRP inhibits complement-mediated cell lysis through its binding to C4BP and Factor H (8, 12). These interactions induce the upregulation of complement inhibitory proteins CD46, CD59, and CD55/DAF and inhibit assembly of the membrane attack complex (MAC) (8, 14).

CRP binds to Fc γ RI, Fc γ RIIA, and Fc γ RIIIB on macrophages and dendritic cells (15-17), and Fc receptors are required for the phagocytosis of CRP-opsonized target cells (6, 10, 18). CRP

binding to Fc γ RI induces Src activation which subsequently triggers the inhibitory Fc γ RIIb and dampens the inflammatory response (15, 19). CRP additionally promotes dendritic cell maturation and humoral immunity (10). In cardiovascular disease, CRP binds to oxidized LDL, exacerbates tissue damage in coronary artery infarction, and inhibits the repair of injured vascular endothelium (7, 19, 20).

The Quantikine® Human C-Reactive Protein/CRP Immunoassay is a 4.5 hour solid-phase ELISA designed to measure human CRP in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains NS0-expressed recombinant human CRP and has been shown to accurately quantitate the recombinant factor. Results obtained using natural human CRP showed linear curves that were parallel to the standard curves obtained using the Quantikine® kit standards. These results indicate that this kit can be used to determine relative mass values for natural human CRP.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for human CRP has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any CRP present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked monoclonal antibody specific for human CRP is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of CRP bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with calibrator diluent and repeat the assay.
- Any variation in diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- This assay is designed to eliminate interference by other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine® Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of Wash Buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.
- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.

PRECAUTIONS

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution.

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Color Reagent B may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Refer to the SDS on our website prior to use.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	CATALOG # DCRP00	CATALOG # SCRPO0	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human CRP Microplate	893167	1 plate	6 plates	96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody specific for human CRP.	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human CRP Conjugate	893168	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a monoclonal antibody specific for human CRP conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human CRP Standard	893169	1 vial	6 vials	50 ng/vial of recombinant human CRP in a buffered protein base with preservatives.	
Assay Diluent RD1F	895041	2 vials	12 vials	6 mL/vial of a buffered protein base with preservatives. <i>May contain a precipitate. Mix well before and during use.</i>	
Calibrator Diluent RD5P	895151	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a concentrated buffered protein base with preservatives. <i>Use diluted 1:5 in this assay.</i>	
Wash Buffer Concentrate	895003	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	1 vial	6 vials	12 mL/vial of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	1 vial	6 vials	12 mL/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895032	1 vial	6 vials	6 mL/vial of 2 N sulfuric acid.	
Plate Sealers	N/A	4 strips	24 strips	Adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

DCRP00 contains sufficient materials to run an ELISA on one 96 well plate. SCRPO0 (SixPak) contains sufficient materials to run ELISAs on six 96 well plates.

This kit is also available in a PharmPak (R&D Systems®, Catalog # PDCRP00). PharmPaks contains sufficient materials to run ELISAs on 50 microplates. Specific vial counts of each component may vary. Refer to the PharmPak Contents section for specific vial counts.

PHARMPAK CONTENTS

Each PharmPak contains reagents sufficient for the assay of 50 microplates (96 wells/plate). The package inserts supplied are the same as those supplied in the single kit packs and because of this, a few minor differences related to the number of reagents and their container sizes should be noted.

- Sufficient material is supplied to perform at least 50 standard curves; reuse of each vial may be required. The number of vials, and the number of standard curves obtained per vial will vary with the analyte.
- Wash Buffer 25X Concentrate is bulk packed in 125 mL bottles containing 100 mL, and not in the glass vials described in the package insert. **Note:** *Additional wash buffer is available for purchase (R&D Systems®, Catalog # WA126).*

The reagents provided in this PharmPak are detailed below.

PART	PART #	QUANTITY
Human CRP Microplate	893167	50 plates
Human CRP Conjugate	893168	50 vials
Human CRP Standard	893169	25 vials
Calibrator Diluent RD5P	895151	50 vials
Assay Diluent RD1F	895041	100 vials
Color Reagent A	895000	50 vials
Color Reagent B	895001	50 vials
Wash Buffer Concentrate, 25X	895126	9 bottles
Stop Solution	895032	50 vials
Plate Sealers	N/A	100 sheets
Package Insert	751797	2 booklets

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- 100 mL 500 mL graduated cylinders.
- **Polypropylene** test tubes for dilution of standards and samples.
- Human CRP Controls (Optional; R&D Systems®, Catalog # QC70).

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifugation for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Note: *Citrate plasma has not been validated for use in this assay.*

SAMPLE PREPARATION

Use polypropylene test tubes.

Serum and plasma samples require a 100-fold dilution. A suggested 100-fold dilution is 10 μ L of sample + 990 μ L of Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5)*.

See Reagent Preparation section.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

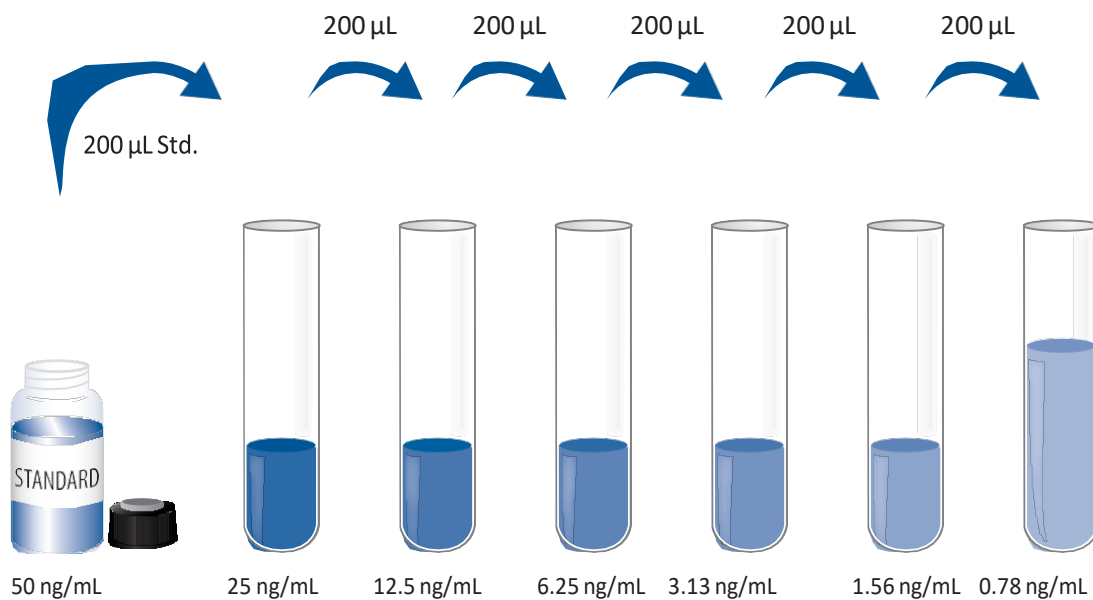
Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to 480 mL of deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 200 μ L of the resultant mixture is required per well.

Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5) - Add 20 mL of Calibrator Diluent RD5P to 80 mL of deionized or distilled water to prepare 100 mL of Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5).

Human CRP Standard - Use polypropylene tubes. Pipette 200 μ L of Calibrator Diluent RD5P (diluted 1:5) into each tube. Add 200 μ L of the Human CRP Standard to the 25 ng/mL tube and continue the dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The Human CRP Standard (50 ng/mL) serves as the high standard. Calibrator Diluent RD5P

(diluted 1:5) serves as the zero standard (0 ng/mL).



ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all standards, controls, and samples be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 100 μL of Assay Diluent RD1F to each well. *May contain a precipitate. Mix well before and during use.*
4. Add 50 μL of standard, control, or sample* per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of four washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 200 μL of Human CRP Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 200 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 30 minutes at room temperature on the benchtop. **Protect from light.**
9. Add 50 μL of Stop Solution to each well. The color in the wells should change from blue to yellow. If the color in the wells is green or the color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

*Samples may require dilution. See Sample Preparation section.

CALCULATION OF RESULTS

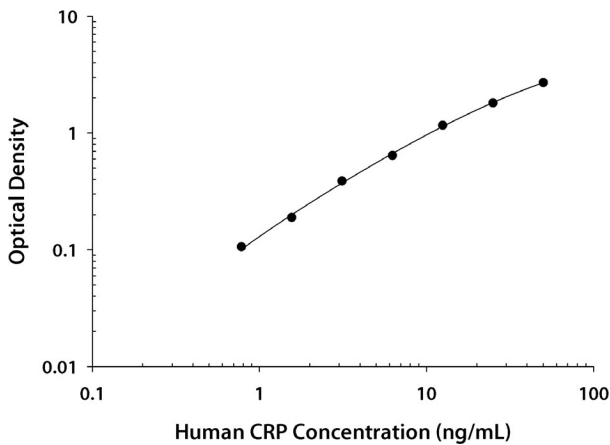
Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human CRP concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.



(ng/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.009 0.010	0.010	—
0.78	0.112 0.119	0.116	0.106
1.56	0.194 0.204	0.199	0.189
3.13	0.392 0.406	0.399	0.389
6.25	0.645 0.656	0.651	0.641
12.5	1.167 1.176	1.172	1.162
25	1.805 1.834	1.820	1.810
50	2.676 2.746	2.711	2.701

PRECISION

Intra-Assay Precision (Precision within an assay)

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-Assay Precision (Precision between assays)

Three samples of known concentration were tested in forty separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of components.

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	40	40	40
Mean (ng/mL)	4.79	8.66	18.9	4.84	8.66	17.5
Standard deviation	0.21	0.33	1.57	0.29	0.61	1.15
CV (%)	4.4	3.8	8.3	6.0	7.0	6.6

RECOVERY

The recovery of human CRP spiked to levels throughout the range of the assay in cell culture media was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture media (n=4)	100	92-110%

LINEARITY

To assess the linearity of the assay, samples containing and/or spiked with high concentrations of human CRP were serially diluted with the calibrator diluent to produce samples with values within the dynamic range of the assay.

		Cell culture media (n=4)	Serum*(n=4)	EDTA plasma* (n=4)	Heparin plasma* (n=4)
1:2	Average % of Expected	107	101	99	102
	Range (%)	98-112	89-105	95-100	93-111
1:4	Average % of Expected	102	100	96	98
	Range (%)	91-109	84-111	89-106	92-104
1:8	Average % of Expected	100	97	94	96
	Range (%)	88-108	84-108	89-99	91-101
1:16	Average % of Expected	95	97	89	94
	Range (%)	86-104	86-102	88-91	91-97

*Samples were diluted prior to assay as directed in the Sample Preparation section.

SENSITIVITY

Forty assays were evaluated and the minimum detectable dose (MDD) of human CRP ranged from 0.005-0.022 ng/mL. The mean MDD was 0.010 ng/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean O.D. value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against a highly purified NS0-expressed recombinant human CRP produced at R&D Systems®.

The recombinant protein is directly calibrated to the NIBSC/WHO First International Standard 85/506.

SAMPLE VALUES

Serum/Plasma - Samples from apparently healthy volunteers were evaluated for the presence of human CRP in this assay. No medical histories were available for the donors used in this study.

Sample Type	Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)	Standard Deviation (ng/mL)
Serum (n=35)	1769	109-4291	1214
EDTA plasma (n=35)	1547	104-4185	1082
Heparin plasma (n=35)	1624	108-4523	1138

Note: *Four additional serum, EDTA plasma, and heparin plasma patient sample sets were tested and resulted in substantially higher values. The values for each donor averaged 7364 ng/mL, 12,363 ng/mL, 16,064 ng/mL, and 43,036 ng/mL.*

Cell Culture Supernates - Human peripheral blood cells (1×10^6 cells/mL) were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 50 μ M β -mercaptoethanol,

2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin sulfate. Cells were cultured unstimulated or stimulated with 10 μ g/mL PHA. Aliquots of the cell culture supernate were removed and assayed for levels of human CRP. No detectable levels were observed.

SPECIFICITY

This assay recognizes natural and recombinant human CRP.

The factors listed below were prepared at 500 ng/mL in calibrator diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 500 ng/mL in a mid-range recombinant human CRP control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Recombinant human:

Pentraxin 2/SAP

Pentraxin 3/TSG-14

Recombinant mouse:

CRP

Pentraxin 3/TSG-14

Recombinant rat:

CRP

Pentraxin 2/SAP

1. Du Clos, T.W. and C. Mold (2011) *Curr. Opin. Organ Transplant.* **16**:15.
2. Ahmed, M.S *et al.* (2012) *ISRN Inflamm.* **2012**:953461.3.
- Pepys, M.B. *et al.* (1979) *Nature* **278**:259.
4. Shrive, A.K. *et al.* (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**:346.
5. Oliveira, E.B. *et al.* (1979) *J. Biol. Chem.* **254**:489.
6. Mold, C. *et al.* (2002) *J. Autoimmun.* **19**:147.
7. Chang, M-K. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13043. 8.
- Gershov, D. *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* **192**:1353.
9. Mukerji, R. *et al.* (2012) *J. Immunol.* **189**:5327.
10. Thomas-Rudolph, D. *et al.* (2007) *J. Immunol.* **178**:7283.
11. McGrath, F.D.G. *et al.* (2006) *J. Immunol.* **176**:2950.
12. Sjoberg, A.P. *et al.* (2006) *J. Immunol.* **176**:7612.
13. Okemefuna, A.I. *et al.* (2010) *J. Biol. Chem.* **285**:1053.
14. Li, S-H. *et al.* (2004) *Circulation* **109**:833.
15. Marjon, K.D. *et al.* (2009) *J. Immunol.* **182**:1397.
16. Manolov, D.E. *et al.* (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**:2372. 17. Stein, M.P. *et al.* (2000) *J. Immunol.* **164**:1514.
18. Bodman-Smith, K.B. *et al.* (2004) *J. Leukoc. Biol.* **75**:1029.
19. Sundgren, N.C. *et al.* (2011) *Circ. Res.* **109**:1132.
20. Griselli, M. *et al.* (1999) *J. Exp. Med.* **190**:1733.

Use this plate layout to record standards and samples assayed.

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

All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

©2018 R&D Systems®, Inc.

08.06

751797.7

8/18

Human IL-6 High Sensitivity ELISA

Enzyme-linked Immunosorbent Assay for quantitative detection of human IL-6

Catalog Number BMS213HS

Pub. No. MAN0016559 Rev. D.0 (33)

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Product description

The Human IL-6 High Sensitivity ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of human IL-6.

Summary

Interleukin-6 (IL-6) is a multi-functional cytokine that regulates immune responses, acute phase reactions and hematopoiesis and may play a central role in host defense mechanisms. The gene for human IL-6 has been localized to chromosome 7p21. The genomic sequence has been determined. IL-6 is usually not produced constitutively by

normal cells, but its expression is readily induced by a variety of cytokines, lipopolysaccharide or viral infections. The IL-6 gene product is a single chain protein with a molecular mass ranging from 21 to 28 kDa, depending on the cellular source. Extensive posttranslational modifications like N- and O-linked glycosylation as well as phosphorylation seem to account for this heterogeneity. The cDNA for IL-6 predicts a precursor protein of 212 amino acids.

IL-6 is a pleiotropic cytokine produced by a variety of cells. It acts on a wide range of tissues, exerting growth-induction, growth-inhibition, and differentiation respectively, depending on the nature of the target cells.

IL-6 is involved in

- the induction of B-cell differentiation,
- the induction of acute phase proteins in liver cells,
- growth promotion of myeloma/plasmacytoma/hybridoma cells,
- induction of IL-2 and IL-2 receptor expression,
- proliferation and differentiation of T cells,
- inhibition of cell growth of certain myeloid leukemic cell lines and induction of their differentiation to macrophages,
- enhancement of IL-3-induced multipotential colony cell formation in hematopoietic stem cells and induction of maturation of megakaryocytes as a thrombopoietic factor,
- induction of mesangial cell growth,
- induction of neural differentiation of PC 12 cells and
- induction of keratinocyte growth.

The abnormal production of IL-6 was first suggested to be related to polyclonal B-cell activation with autoantibody production in patients with cardiac myxoma. Since then, IL-6 has been suggested to be involved in the pathogenesis of a variety of diseases.

For literature update refer to our website.

Principles of the test

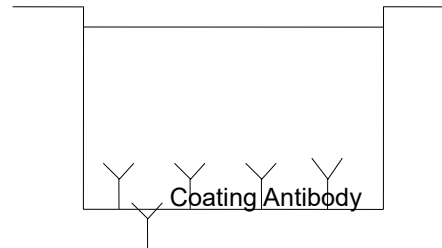
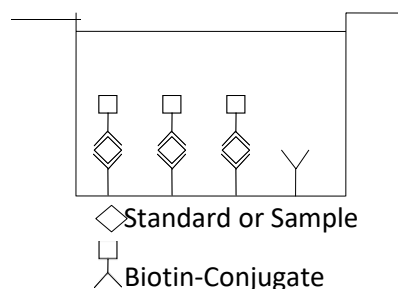


Fig. 1 Coated microwell

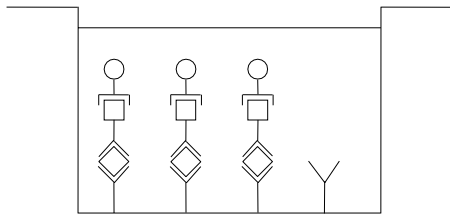
Human IL-6 present in the sample or standard binds to antibodies adsorbed to the microwells. A biotin-conjugated anti-human IL-6 antibody is added and binds to human IL-6 captured by the first antibody.



An anti-human IL-6 coating antibody is adsorbed onto microwells.

Fig. 2 First incubation

Following incubation unbound biotin-conjugated anti-human IL-6 antibody is removed during a wash step. Streptavidin-HRP is added and binds to the biotin-conjugated anti-human IL-6 antibody.



 Streptavidin_in-HRP

Fig. 3 Second incubation

Following incubation unbound Streptavidin-HRP is removed during a wash step, and amplification reagent I (Biotinyl-Tyramide) is added to the wells.

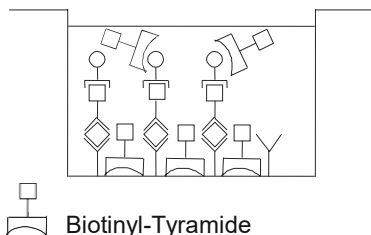


Fig. 4 Third incubation

Following incubation unbound amplification reagent I is removed during a wash step and amplification reagent II (Streptavidin-HRP) is added.

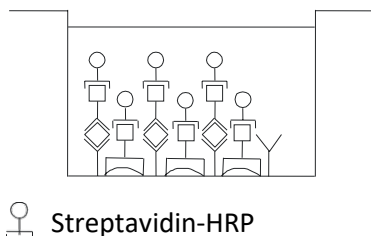


Fig. 5 Fourth incubation

Following incubation unbound amplification reagent II is removed during a wash step and substrate solution reactive with HRP is added.

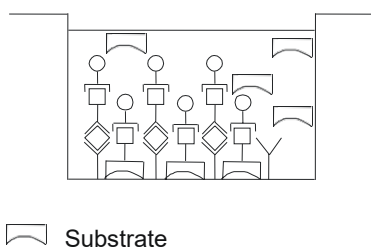


Fig. 6 Fifth incubation

A colored product is formed in proportion to the amount of human IL-6 present in the sample or standard. The reaction is terminated by addition of acid and absorbance is measured at 450 nm. A standard curve is prepared from 7 human IL-6 standard dilutions and human IL-6 sample concentration determined.

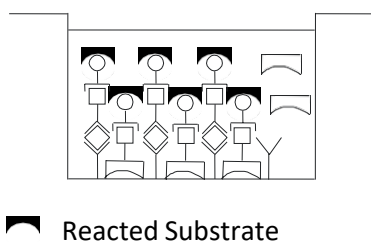


Fig. 7 Stop reaction
Principle of amplification reaction

The amplification reaction is based upon PerkinElmer Life Sciences TSA™ technology.

Amplification reagent I contains biotinyl-tyramide. HRP converts multiple biotinyl-tyramide molecules into highly reactive derivatives (free radicals). These free radicals bind covalently to any protein in the well.

Thus, the amount of reacted biotinyl-tyramide is proportional to the amount of HRP in the well.

Following incubation unbound biotinyl-tyramide is removed during a wash step. Amplification reagent II contains Streptavidin-HRP, which binds to the biotin sites created during the biotinyl-tyramide reaction, thus multiplying the HRP molecules available at the surface for the substrate reaction.

Reagents provided

1 aluminum pouch with a Microwell Plate (12 strips of 8 wells each) coated with monoclonal antibody to human IL-6

1 vial (100 µL) Biotin-Conjugate anti-human IL-6 monoclonal antibody
1 vial (150 µL) Streptavidin-HRP

2 vials human IL-6 Standard lyophilized, 200 pg/mL upon reconstitution

1 vial Control high, lyophilized
1 vial Control low, lyophilized

1 vial (5 mL) Assay Buffer Concentrate 20x (PBS with 1% Tween 20 and 10% BSA)

1 vial (25 mL) Sample Diluent

1 vial (7 mL) Amplification Diluent Concentrate (2x)
1 vial (75 µL) Amplification Reagent I

Note: reagent contains ethyl alcohol

2 vials (15 µL) Amplification Reagent II

2 bottles (50 mL) Wash Buffer Concentrate 20x (PBS with 1% Tween 20)
1 vial (15 mL) Substrate Solution (tetramethyl-benzidine)

1 vial (15 mL) Stop Solution (1M Phosphoric acid)
8 Adhesive Films

Storage instructions – ELISA kit

Store kit reagents between 2° and 8°C except controls. Store lyophilized controls at -20°C.

Immediately after use remaining reagents should be returned to cold storage (2° to 8°C), controls to -20°C, respectively. Expiry of the kit and reagents is stated on labels.

Expiry of the kit components can only be guaranteed if the components are stored properly, and if, in case of repeated use of one component, this reagent is not contaminated by the first handling.

Sample collection and storage instructions

Cell culture supernatant, serum, and plasma (EDTA, heparin) were tested with this assay. Other biological samples might be suitable for use in the assay. Remove serum or plasma from the clot or cells as soon as possible after clotting and separation.

Samples containing a visible precipitate must be clarified prior to use in the assay. Do not use grossly hemolyzed or lipemic samples.

Samples should be aliquoted and must be stored frozen at -20°C to avoid loss of bioactive human IL-6. If samples are to be run within 24 hours, they may be stored at 2–8°C (for sample stability refer to "Sample stability" on page 7).

Avoid repeated freeze-thaw cycles. Prior to assay, the frozen samples should be brought to room temperature slowly and mixed gently.

Materials required but not provided

- 5 mL and 10 mL graduated pipettes
- 5 µL to 1000 µL adjustable single channel micropipettes with disposable tips
- 50 µL to 300 µL adjustable multichannel micropipette with disposable tips
- Multichannel micropipette reservoir
- Beakers, flasks, cylinders necessary for preparation of reagents
- Device for delivery of wash solution (multichannel wash bottle or automatic wash system)
- Microplate shaker
- Microwell strip reader capable of reading at 450 nm (620 nm as optional reference wave length)
- Glass-distilled or deionized water
- Statistical calculator with program to perform regression analysis

Precautions for use

- All chemicals should be considered as potentially hazardous. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses, and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water. See material safety data sheet(s) and/or safety statement(s) for specific advice.
- Reagents are intended for research use only and are not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or other sources.
- Do not use kit reagents beyond expiration date on label.
- Do not expose kit reagents to strong light during storage or incubation.
- Do not pipet by mouth.
- Do not eat or smoke in areas where kit reagents or samples are handled.
- Avoid contact of skin or mucous membranes with kit reagents or samples.
- Rubber or disposable latex gloves should be worn while handling kit reagents or samples.
- Avoid contact of substrate solution with oxidizing agents and metal.
- Avoid splashing or generation of aerosols.
- To avoid microbial contamination or cross-contamination of reagents or samples that may invalidate the test, use disposable pipette tips and/or pipettes.
- Use clean, dedicated reagent trays for dispensing the conjugate and substrate reagent.
- Exposure to acid inactivates the conjugate.
- Glass-distilled water or deionized water must be used for reagent preparation.
- Substrate solution must be at room temperature prior to use.
- Decontaminate and dispose samples and all potentially contaminated materials as if they could contain infectious agents.

The preferred method of decontamination is autoclaving for a minimum of 1 hour at 121.5°C.

- Liquid wastes not containing acid and neutralized waste may be mixed with sodium hypochlorite in volumes such that the final mixture contains 1.0% sodium hypochlorite. Allow 30 minutes for effective decontamination. Liquid waste containing acid must be neutralized prior to the addition of sodium hypochlorite.

Preparation of reagents

1. Buffer concentrates should be brought to room temperature and should be diluted before starting the test procedure.
2. If crystals have formed in the Buffer Concentrates, warm them gently until they have completely dissolved.

Wash buffer (1x)

1. Pour entire contents (50 mL) of the Wash Buffer Concentrate (20x) into a clean 1000 mL graduated cylinder. Bring to final volume of 1000 mL with glass-distilled or deionized water. Mix gently to avoid foaming.
2. Transfer to a clean wash bottle and store at 2° to 25°C. Please note that Wash Buffer (1x) is stable for 30 days.
3. Wash Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (20x) (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	25	475

Assay buffer (1x)

1. Pour the entire contents (5 mL) of the Assay Buffer Concentrate (20x) into a clean 100 mL graduated cylinder. Bring to final volume of 100 mL with distilled water. Mix gently to avoid foaming.
2. Store at 2° to 8°C. Please note that the Assay Buffer (1x) is stable for 30 days.
3. Assay Buffer (1x) may also be prepared as needed according to the following table:

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (20X) (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

Biotin-Conjugate

Note: The Biotin-Conjugate should be used within 30 minutes after dilution.

Make a 1:100 dilution of the concentrated Biotin-Conjugate solution with Sample Diluent in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (mL)	Sample Diluent (mL)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

Streptavidin-HRP

Note: The Streptavidin-HRP should be used within 30 minutes after dilution.

Make a 1:200 dilution of the concentrated Streptavidin-HRP solution with Assay Buffer (1x) in a clean plastic tube as needed according to the following table:

Number of Strips	Streptavidin-HRP (mL)	Assay Buffer (1x) (mL)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

Human IL-6 standard

1. Reconstitute human IL-6 standard by addition of distilled water. Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial. Swirl or mix gently to insure complete and homogeneous solubilization (concentration of reconstituted standard = 200 pg/mL).
2. Allow the standard to reconstitute for 10-30 minutes. Mix well prior to making dilutions.
3. After usage remaining standard cannot be stored and has to be discarded.
4. The concentrated human IL-6 standard must be diluted 1:20 with Sample Diluent just prior to use in a clean plastic test tube according to the following dilution scheme:
50 µL concentrated human IL-6 standard + 950 µL Sample Diluent. Shake gently to mix (concentration of standard = 10 pg/mL).
5. Standard dilutions can be prepared directly on the microwell plate (see "Test protocol" on page 4) or alternatively in tubes (see "External standard dilution" on page 4).

1 - 12	50	950
--------	----	-----

Take care not to scratch the inner surface of the microwells. Continue this procedure 5 times, creating two rows of human IL-6 standard dilutions ranging from 5.00 to 0.08 pg/mL. Discard 100 μ L of the contents from the last microwells (G1, G2) used.

In case of an external standard dilution (see "External standard dilution" on page 4.), pipette 100 μ L of these standard dilutions (S1 - S7) in the standard wells according to Table 1.

4. Add 100 μ L of Sample Diluent in duplicate to the blank wells.
5. Add 50 μ L of Sample Diluent to the sample wells.
6. Add 50 μ L of each sample in duplicate to the sample wells.
7. Prepare Biotin-Conjugate (see Preparation of Biotin-Conjugate "Biotin-Conjugate" on page 3).
 8. Add 50 μ L of Biotin-Conjugate to all wells.
9. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18° to 25°C) for 2 hours on a microplate shaker. (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
10. Prepare Streptavidin-HRP (refer to Preparation of Streptavidin-HRP "Streptavidin-HRP" on page 3).
11. Remove adhesive film and empty wells. Wash microwell strips 6 times according to point 2. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
12. Add 100 μ L of diluted Streptavidin-HRP to all wells, including the blank wells.
13. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18° to 25°C) for 1 hour on a microplate shaker. (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
14. Prepare Amplification Solution I diluted in Amplification Diluent (1x) (see Preparation of Amplification Solution I "Amplification Solution I" on page 4) immediately prior to use.
15. Remove adhesive film and empty wells. Wash microwell strips 6 times according to point 2. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
16. Add 100 μ L of Amplification Solution I to all wells, including the blank wells.
 17. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18° to 25°C) for exactly 15 minutes, on a microplate shaker. (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
18. Prepare Amplification Solution II diluted in Assay buffer (see Preparation of Amplification Solution II "Amplification Solution II" on page 4) immediately prior to use.
19. Remove adhesive film and empty wells. Wash microwell strips 6 times according to point 2. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
20. Add 100 μ L of Amplification Solution II to all wells, including the blank wells.
 21. Cover with an adhesive film and incubate at room temperature (18° to 25°C) for exactly 30 minutes on a microplate shaker. (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
22. Remove adhesive film and empty wells. Wash microwell strips 6 times according to point 2. of the test protocol. Proceed immediately to the next step.
23. Pipette 100 μ L of TMB Substrate Solution to all wells.
24. Incubate the microwell strips at room temperature (18° to 25°C) for about 10-20 minutes. Avoid direct exposure to intense light.

The color development on the plate should be monitored and the substrate reaction stopped (see next point of this protocol) before positive wells are no longer properly recordable. Determination of the ideal time period for color development has to be done individually for each assay.

It is recommended to add the stop solution when the highest standard has developed a dark blue color. Alternatively the color development can be monitored by the ELISA reader at 620 nm. The substrate reaction should be stopped as soon as Standard 1 has reached an OD of 0.9 – 0.95.

25. Stop the enzyme reaction by quickly pipetting 100 μ L of Stop Solution into each well. It is important that the Stop Solution is spread quickly and uniformly throughout the microwells to completely inactivate the enzyme. Results must be read immediately after the Stop Solution is added or within one hour if the microwell strips are stored at 2 - 8°C in the dark.
26. Read absorbance of each microwell on a spectro-photometer using 450 nm as the primary wave length (optionally 620 nm as the reference wave length; 610 nm to 650 nm is acceptable). Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions by using the blank wells. Determine the absorbance of both the samples and the standards.

Calculation of results

- Calculate the average absorbance values for each set of duplicate standards and samples. Duplicates should be within 20 percent of the mean value.
- Create a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard concentration on the ordinate against the human IL-6 concentration on the abscissa. Draw a best fit curve through the points of the graph (a 5-parameter curve fit is recommended).
- To determine the concentration of circulating human IL-6 for each sample, first find the mean absorbance value on the ordinate and extend a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, extend a vertical line to the abscissa and read the corresponding human IL-6 concentration.
- If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:2 (50 μ L sample + 50 μ L Sample Diluent) and controls 1:40 (50 μ L of 1:20 prediluted control + 50 μ L Sample Diluent). Thus concentrations read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor ($\times 2$ for samples, $\times 40$ for controls).
- Calculation of samples with a concentration exceeding standard 1 may result in incorrect, low human IL-6 levels. Such samples require further external predilution according to expected human IL-6 values with Sample Diluent in order to precisely quantitate the actual human IL-6 level.
- It is suggested that each testing facility establishes a control sample of known human IL-6 concentration and runs this additional control with each assay. If the values obtained are not within the expected range of the control, the assay results may be invalid.

- A representative standard curve is shown in Figure 10.

Note: Do not use this standard curve to derive test results. Each laboratory must prepare a standard curve for each group of microwell strips assayed.

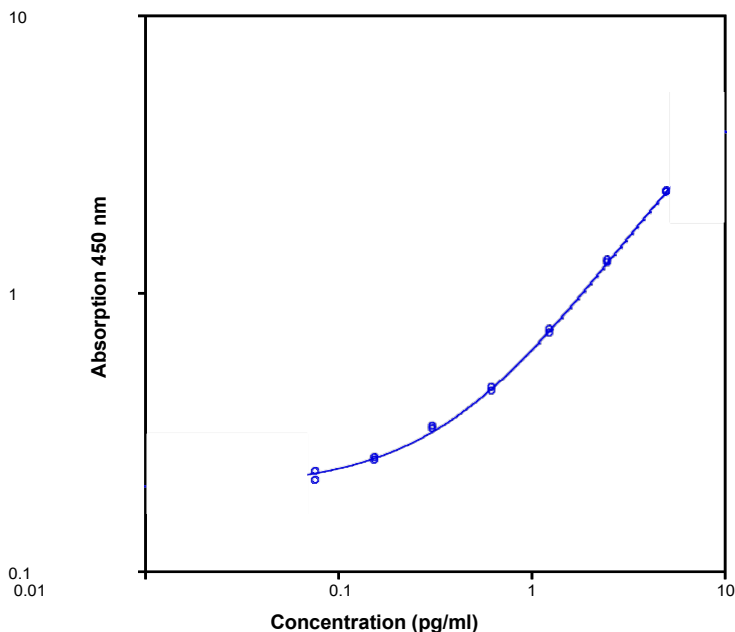


Fig. 10 Representative standard curve for human IL-6 ELISA. Human IL-6 was diluted in serial 2-fold steps in Sample Diluent.

Table 2 Typical data using the human IL-6 ELISA.

Measuring wavelength: 450 nm
Reference wavelength: 620 nm

Standard	Human IL-6 Concentration (pg/mL)	O.D. at 450 nm	Mean O.D. at 450 nm	C.V. (%)
1	5.00	2.298 2.293	2.296	0.1
2	2.50	1.308 1.271	1.290	1.4
3	1.25	0.714 0.737	0.726	1.6
4	0.63	0.442 0.454	0.448	1.4
5	0.31	0.325 0.331	0.328	1.0
6	0.16	0.255 0.250	0.253	0.8
7	0.08	0.228 0.211	0.220	4.0
Blank	0.00	0.124 0.135	0.130	4.3

The OD values of the standard curve may vary according to the conditions of assay performance (e.g., operator, pipetting technique, washing technique, or temperature effects). Furthermore, shelf life of the kit may affect enzymatic activity and thus color intensity. Values measured are still valid.

Limitations

- Since exact conditions may vary from assay to assay, a standard curve must be established for every run.
- Bacterial or fungal contamination of either screen samples or reagents or cross-contamination between reagents may cause erroneous results.
- Disposable pipette tips, flasks or glassware are preferred, reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed of all detergents before use.

- Improper or insufficient washing at any stage of the procedure will result in either false positive or false negative results. Empty wells completely before dispensing fresh wash solution, fill with Wash Buffer as indicated for each wash cycle and do not allow wells to sit uncovered or dry for extended periods.
- The use of radioimmunotherapy has significantly increased the number of subjects with human anti-mouse IgG antibodies (HAMA). HAMA may interfere with assays utilizing murine monoclonal antibodies leading to both false positive and false negative results. Serum samples containing antibodies to murine immunoglobulins can still be analyzed in such assays when murine immunoglobulins (serum, ascitic fluid, or monoclonal antibodies of irrelevant specificity) are added to the sample.

Performance characteristics

Sensitivity

The limit of detection of human IL-6 defined as the analyte concentration resulting in an absorbance significantly higher than that of the dilution medium (mean plus 2 standard deviations) was determined to be 0.03 pg/mL (mean of 6 independent assays).

Reproducibility

Intra-assay

Reproducibility within the assay was evaluated in 3 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 8 serum samples containing different concentrations of human IL-6. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human IL-6 concentration and the coefficient of variation for each sample (see Table 3). The calculated overall intra-assay coefficient of variation was 4.9%.

Table 3 The mean human IL-6 concentration and the coefficient of variation for each sample

Sample	Experiment	Mean Human IL-6 Concentration (pg/mL)	Coefficient of Variation (%)
1	1	13.33	2.5
	2	13.12	1.3
	3	13.84	0.3
2	1	9.75	2.3
	2	9.66	6.0
	3	9.92	3.8
3	1	4.40	5.6
	2	4.52	3.1
	3	4.68	8.0
4	1	4.77	2.0
	2	5.25	4.0
	3	5.55	6.0
5	1	1.71	5.4
	2	1.59	6.2
	3	1.58	6.2
6	1	1.81	7.2
	2	1.59	4.6
	3	1.72	3.1
7	1	1.28	3.4
	2	1.12	4.1
	3	1.10	3.9
8	1	0.56	7.0
	2	0.53	6.6
	3	0.43	15.9

Inter-assay

Assay to assay reproducibility within one laboratory was evaluated in 2 independent experiments. Each assay was carried out with 6 replicates of 8 serum samples containing different concentrations of human IL-6. 2 standard curves were run on each plate. Data below show the mean human IL-6 concentration and the coefficient of

variation calculated on 18 determinations of each sample (see Table 4). The calculated overall inter-assay coefficient of variation was 6.0%.

Table 4 The mean human IL-6 concentration and the coefficient of variation of each sample

Sample	Mean Human IL-6 Concentration (pg/mL)	Coefficient of Variation (%)
1	13.43	2.7
2	9.77	1.4
3	4.53	3.1
4	5.19	7.6
5	1.62	4.5
6	1.71	6.7
7	1.17	8.3
8	0.50	13.6

Spike recovery

The spike recovery was evaluated by spiking 3 levels of human IL-6 into cell culture supernatant, serum and plasma (EDTA, heparin) samples. Recoveries were determined in 2 independent experiments with 8 replicates each. The amount of endogenous human IL-6 in unspiked serum was subtracted from the spike values.

Sample matrix	Spike high (%)	Spike medium (%)	Spike low (%)
Serum	106	104	nd ^[1]
Plasma (EDTA)	109	100	nd ^[1]
Plasma (heparin)	106	97	nd ^[1]
Cell culture supernatant	112	115	123

^[1] Due to high endogen product levels, data for low spikes are not indicated.

Dilution parallelism

Cell culture supernatant, serum, and plasma (EDTA, heparin) samples with different levels of human IL-6 were analyzed at serial 2-fold dilutions with 4 replicates each.

Sample matrix	Recovery of exp. val.	
	Range (%)	Mean (%)
Serum	73–121	96
Plasma (EDTA)	78–83	81
Plasma (heparin)	71–112	90
Cell culture supernatant	57–73	66

Sample stability

Freeze-Thaw stability

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C and thawed 5 times, and the human IL-6 levels determined. There was no significant loss of human IL-6 immunoreactivity detected by freezing and thawing.

Storage stability

Aliquots of serum samples (spiked or unspiked) were stored at -20°C, 2–8°C, room temperature, and at 37°C, and the human IL-6 level determined after 24 hours. There was no significant loss of human IL-6 immunoreactivity detected during storage under above conditions.

Specificity

The interference of circulating factors of the immune system was evaluated by spiking these proteins at physiologically relevant concentrations into a human IL-6 positive serum. No cross-reactivity was detected.

Expected values

A panel of 40 serum and plasma (EDTA, heparin) samples from randomly selected apparently healthy donors (males and females) was tested for human IL-6. The normal levels measured may vary with the sample collective used. For detected human IL-6 levels.

Sample matrix	Number of samples evaluated	Range (pg/mL)	Detectable (%)	Mean of detectable (pg/mL)
Serum	40	1.1–14.3	100	3.6
Plasma (EDTA)	40	nd ^[1] –8.7	93	2.5
Plasma (heparin)	40	0.2–6.1	100	2.3

^[1] nd = nondetectable, samples measured below the lowest standard point are considered to be nondetectable.

Calibration

This immunoassay is calibrated with highly purified recombinant human IL-6, which has been evaluated against the International Reference Standard NIBSC 89/548 and has been shown to be equivalent.

NIBSC 89/548 is quantitated in International Units (IU), 1IU corresponding to 10 pg human IL-6.

Reagent preparation summary

Wash buffer (1x)

Add Wash Buffer Concentrate 20x (50 mL) to 950 mL distilled water.

Number of Strips	Wash Buffer Concentrate (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	25	475
1 - 12	50	950

Assay buffer (1x)

Add Assay Buffer Concentrate 20x (5 mL) to 95 mL distilled water.

Number of Strips	Assay Buffer Concentrate (mL)	Distilled Water (mL)
1 - 6	2.5	47.5
1 - 12	5.0	95.0

Biotin-Conjugate

Make a 1:100 dilution of Biotin-Conjugate in Sample Diluent:

Number of Strips	Biotin-Conjugate (mL)	Sample Diluent (mL)
1 - 6	0.03	2.97
1 - 12	0.06	5.94

Streptavidin-HRP

Make a 1:200 dilution of Streptavidin-HRP in Assay Buffer (1x):

Number of Strips	Streptavidin-HRP (mL)	Assay Buffer (1x) (mL)
1 - 6	0.03	5.97
1 - 12	0.06	11.94

Human IL-6 standard

Reconstitute lyophilized human IL-6 standard with distilled water. (Reconstitution volume is stated on the label of the standard vial.) The concentrated human IL-6 standard must be diluted 1:20 with Sample Diluent.

Amplification diluent (1x)

Prepare Amplification Diluent (1x) immediately prior to use.

Number of Strips	Amplification Diluent (2x) (mL)	Distilled Water (mL)
1-6	3	3
1-12	6	6

Amplification Solution I

Dilute Amplification Reagent I in Amplification Diluent (1x) immediately prior to application on the plate as indicated in the Certificate of Analysis.

Amplification Solution II

Centrifuge vial for a few seconds in a micro-centrifuge before opening to collect liquid trapped in the lid. Dilute Amplification Solution II in Assay Buffer (1x) immediately prior to application on the plate as indicated in the Certificate of Analysis.

Controls

Reconstitute lyophilized controls by addition of distilled water (10-30 minutes). Reconstitution volume is stated on the label of the control vial. Predilute reconstituted controls 1:20 with Sample Diluent.

Test protocol summary

Note: Prepare Amplification Solutions immediately prior to application on the plate. It is extremely important to wash the wells properly to obtain a good test performance.

1. Determine the number of microwell strips required.
2. Wash microwell strips twice with Wash Buffer.
3. Standard dilution on the microwell plate: Add 100 μ L Sample Diluent, in duplicate, to all standard wells. Pipette 100 μ L prepared standard into the first wells and create standard dilutions by transferring 100 μ L from well to well. Discard 100 μ L from the last wells.

Alternatively external standard dilution in tubes (see "External standard dilution" on page 4): Pipette 100 μ L of these standard dilutions in the microwell strips.

4. Add 100 μ L Sample Diluent in duplicate, to the blank wells.
5. Add 50 μ L Sample Diluent to sample wells.
6. Add 50 μ L sample in duplicate, to designated sample wells.
7. Prepare Biotin-Conjugate.
8. Add 50 μ L Biotin-Conjugate to all wells.
9. Cover microwell strips and incubate 2 hours at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
10. Prepare Streptavidin-HRP.
11. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.
12. Add 100 μ L diluted Streptavidin-HRP to all wells.
13. Cover microwell strips and incubate 1 hour at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
14. Prepare Amplification Solution I diluted in Amplification Diluent (1x) immediately prior to application on the plate.
15. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.

16. Add 100 μ L Amplification Solution I to all wells.
17. Cover microwell strips and incubate for exactly 15 minutes at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
18. Prepare Amplification Solution II diluted in Assay buffer (1x) immediately prior to application on the plate.
19. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.
20. Add 100 μ L Amplification Solution II to all wells.
21. Cover microwell strips and incubate for exactly 30 minutes at room temperature (18° to 25°C). (Shaking is absolutely necessary for an optimal test performance.)
22. Empty and wash microwell strips 6 times with Wash Buffer.
23. Add 100 μ L of TMB Substrate Solution to all wells.
24. Incubate the microwell strips for about 10-20 minutes at room temperature (18° to 25°C).
25. Add 100 μ L Stop Solution to all wells.
26. Blank microwell reader and measure color intensity at 450 nm.

Note: If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:2 (50 μ L sample + 50 μ L Sample Diluent) and controls 1:40 (50 μ L of 1:20 prediluted control + 50 μ L Sample Diluent). Thus concentrations read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor ($\times 2$ for samples, $\times 40$ for controls).

Customer and technical support

Visit [thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support) for the latest service and support information.

- Worldwide contact telephone numbers
- Product support information
 - Product FAQs
 - Software, patches, and updates
 - Training for many applications and instruments
- Order and web support
- Product documentation
 - User guides, manuals, and protocols
 - Certificates of Analysis
 - Safety Data Sheets (SDSs; also known as MSDSs)

Note: For SDSs for reagents and chemicals from other manufacturers, contact the manufacturer.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.



Bender MedSystems GmbH | Campus Vienna Biocenter 2 | 1030 Vienna, Austria

For descriptions of symbols on product labels or product documents, go to thermofisher.com/symbols-definition.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. TSA is a trademark of PerkinElmer Life Sciences.

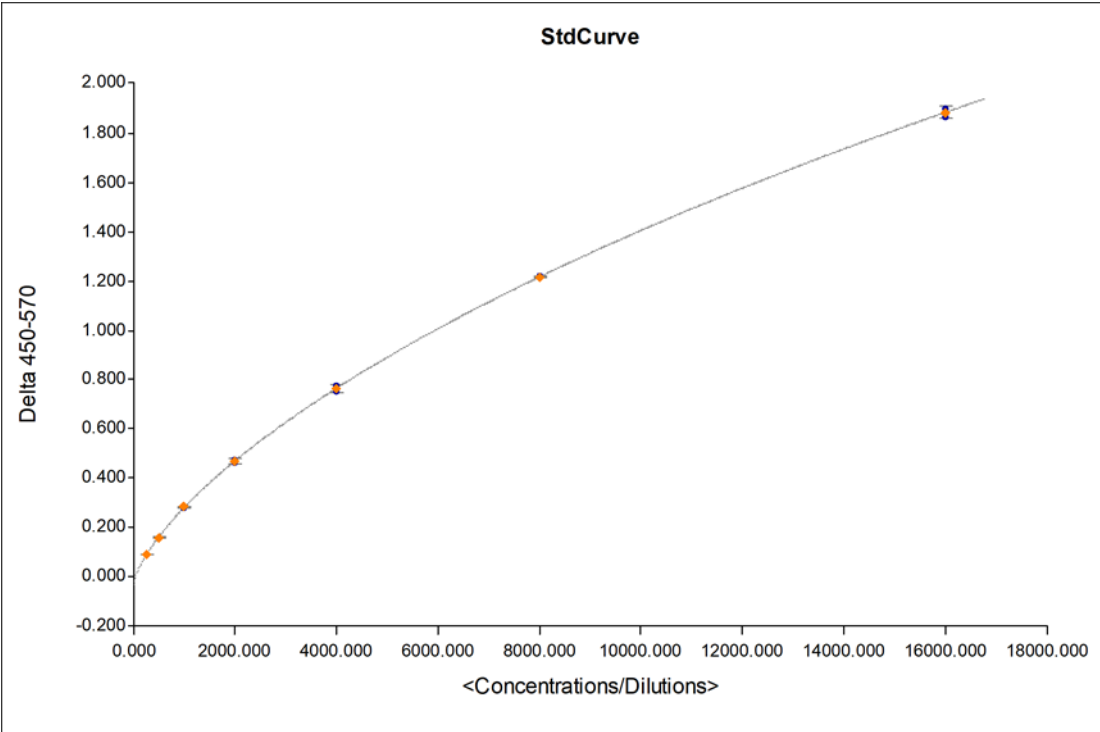
thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion

thermofisher.com

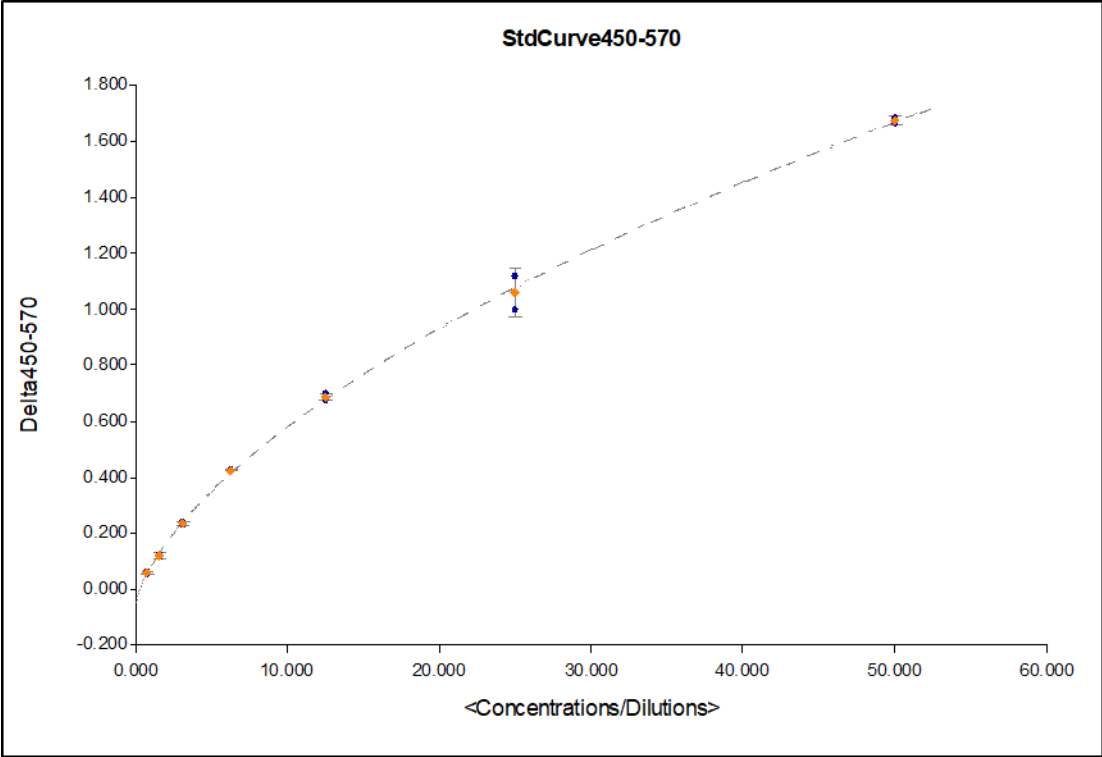
10 January 2020

ThermoFisher
SCIENTIFIC

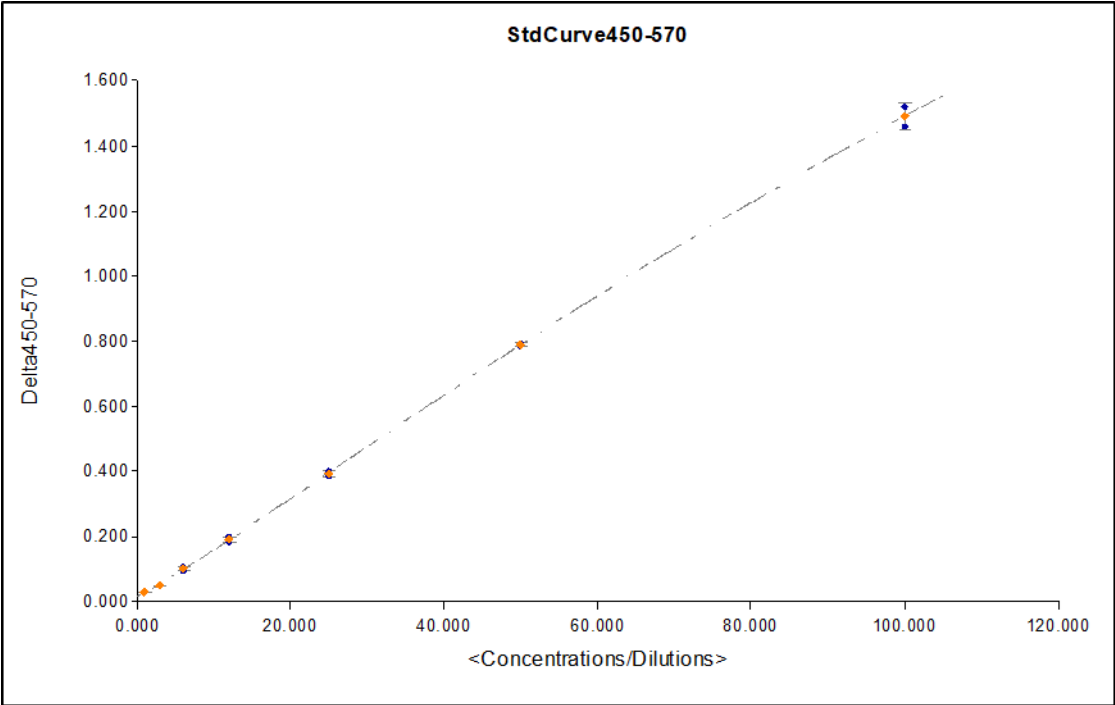
ANEXO 13. Concentración de la curva estándar de sCD14.



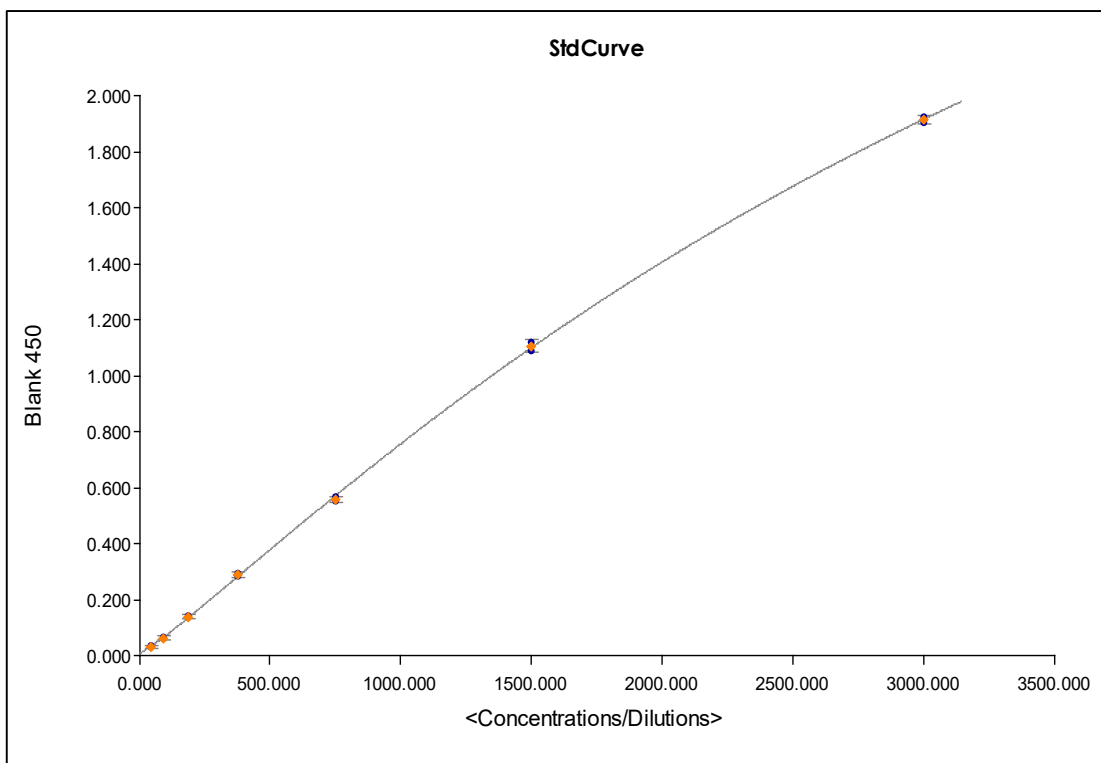
ANEXO 14. Concentración de la curva estándar de PCR



ANEXO 15. Concentración de la curva estándar de sCD163



ANEXO 16. Concentración de la curva estándar de I-FABP



ANEXO 17. Concentración de la curva estándar de IL-6

