

Máster en Zoonosis y  
Una Sola Salud



**Desarrollo de un  
kit para la  
detección *in situ*  
de genes de  
resistencia  
antimicrobiana**

**Curso 2017 - 2018**

**Tutora:** Laila Darwich Soliva

**Directores:** Antoni Baldi Coll y

María Díaz González

**Autor:** Jordi Molina Fontanals

---

# **Desarrollo de un kit para la detección *in situ* de genes de resistencia antimicrobiana**

**Autor:** Jordi Molina Fontanals

**Tutora:** Dra. Laila Darwich Soliva

**Directores:** Dr. Antoni Baldi Coll y Dra. María Díaz González

Tesis de Máster

Máster en Zoonosis y Una Sola Salud

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, Setembre 2018

Firma del autor

Jordi Molina

Firma de la tutora

Laila Darwich Soliva

Firma del director

Antoni Baldi Coll

## AGRADECIMIENTOS

Después de este intenso periodo de prácticas en el Instituto de Microelectrónica de Barcelona (CSIC) he podido experimentar lo que es trabajar en un ámbito multidisciplinar. En estos casos resulta esencial la cooperación de investigadores con formaciones distintas para poder desarrollar proyectos como el *Res-kit*, el cual requiere del desarrollo de un kit físico, pero también de la integración de técnicas biológicas en el mismo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, el Dr. Antoni Baldi y la Dra. María Díaz, así como al Dr. César Fernández, todas las enseñanzas y la ayuda prestada en momentos de duda, especialmente al tratarse de un campo de investigación nuevo para mí.

También me gustaría agradecer a la Dra. Laila Darwich su supervisión y consejos a lo largo de mi trabajo.

Además, querría hacer especial mención a la ayuda prestada por mi compañera Mireia Burdó, con la cual empecé a trabajar, por lo que en numerosas ocasiones pasamos por los mismos dilemas, y que ha estado siempre dispuesta a ayudarme cuando que ha sido necesario.

Finalmente, agradecer a mis padres y a Anna Miret la inestimable confianza, ayuda y apoyo (sentimental y financiero) depositados en mí, ya sea en el día a día o en momentos de especial estrés.

## **ÍNDICE**

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1. Infecciones del tracto urinario (ITU): cistitis.....	2
1.2. Resistencia antimicrobiana asociada a cistitis .....	4
1.3. Técnicas de diagnóstico para las infecciones urinarias.....	6
1.3.1. Métodos de diagnóstico celular .....	8
1.3.2. Métodos de cultivo microbiológico .....	8
1.3.3. Métodos de diagnóstico molecular .....	9
1.4. Nuevas tecnologías microfluídicas basadas en <i>lab-on-a-chip</i> (LOC) .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Diseño, fabricación y montaje de un chip microfluídico .....	15
3.2. Ensayos con ADN.....	18
3.2.1. Funcionalización de esferas .....	18
3.2.2. Ensayo de hibridación tipo sándwich .....	19
3.2.3. Ensayo tipo sándwich con lectura on-chip.....	19
3.2.4. Ensayo tipo sándwich completo on-chip .....	20
3.3. Análisis de secuencias de genes de resistencia.....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
4.1. Diseño, fabricación y montaje de un chip microfluídico .....	23
4.2. Ensayos con ADN.....	23
4.2.1. Ensayo de hibridación tipo sándwich .....	23
4.2.2. Comparación de lecturas on y off-chip .....	25
4.2.3. Ensayo tipo sándwich completo on-chip .....	28
4.3. Sondas para los genes de resistencia.....	28
4.4. Perspectivas de futuro .....	29
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>31</b>
<b>7. ANEXO</b> .....	<b>36</b>

## ABSTRACT

Urinary tract infections (UTIs), and in particular cystitis, are one of the most common hospital-acquired infections in a wide range of countries such as Spain, especially among patients using urinary catheters. Cystitis usually occurs when the urethra and bladder become infected with bacteria, being *Escherichia coli* the most common causative agent (75%-95%). Moreover, acute cystitis remains one of the most common indications for the prescription of antimicrobials to healthy women, increasing antimicrobial resistance among the urinary pathogens that cause acute cystitis.

That is the reason why the design of a pen-site kit for the detection of antimicrobial resistance genes, which exceeds the limitations of the other remaining diagnostic techniques, is essential. This kit will facilitate the treatment of cystitis in order to be able to select the most appropriate treatment in a fast and individualized way.

The aim of the present Final Master Thesis focuses on the realization of a proof of concept of a microfluidic technology that will be applied for the development of the kit. This proof includes the development of a protocol of a DNA test on microspheres and the study of its implementation in a microfluidic device in which to perform the assay in an automated way.

Results suggests that the limit of detection that we will have inside the chip will be lower than the one of the ELISA reader used to make the comparison, allowing us to detect lower concentrations of target DNA. Nevertheless, the obtained absorbance results are higher in the ELISA reader than in our device.

In conclusion, evidence has been obtained showing that the use of the microfluidic technology on which the developed chip is based may offer more advantages than pre-existing diagnostic techniques. This makes the test realization faster, cheaper and safer, among others.

**Keywords:** Urinary tract infection, cystitis, antimicrobial resistance, microfluidics, microspheres.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO (ITU): CISTITIS

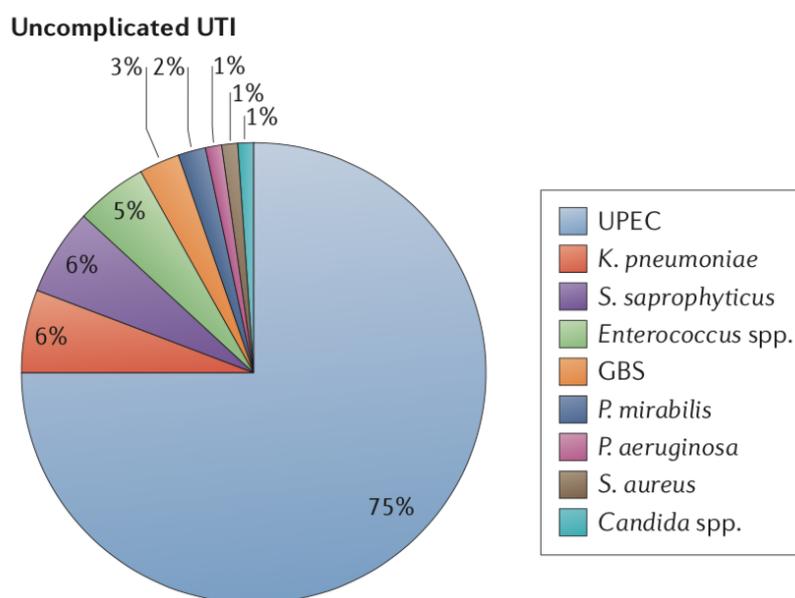
La infección del tracto urinario (ITU) consiste en la colonización y multiplicación microbiana, habitualmente bacteriana, a lo largo del tracto urinario. Se denomina *pielonefritis* si afecta al riñón y a la pelvis renal, *cistitis* si implica a la vejiga, *uretritis* si afecta a la uretra y *prostatitis* si la infección se localiza en la próstata (Monte, 2016).

En cuanto a la epidemiología, las ITU son una de las infecciones nosocomiales más frecuentes en España, y un 80% de ellas están relacionadas con la presencia de una sonda urinaria (Pigrau, 2013). Las ITU son más frecuentes en el sexo femenino, hasta un 50 % de las mujeres puede presentar una ITU a lo largo de su vida, lo que se relaciona con la actividad sexual, los embarazos y la edad. En cambio, en el sexo masculino las ITU están menos presentes, mostrando dos picos de incidencia: durante el primer año de vida y en mayores de 50 años en relación con la presencia de patología prostática o manipulaciones urológicas. Entre las ITU distinguimos entre ITU complicadas y no complicadas (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016). Una ITU no complicada es aquella que se presenta en un huésped que no presenta anomalías estructurales o funcionales, que no está embarazada o que no ha sido instrumentado como por ejemplo mediante un catéter. Todas las demás ITUs se consideran complicadas (Foxman, 2010). Las no complicadas son esencialmente las IU del tracto inferior (cistitis/uretritis), y en general se corresponden con ITU con mínimo riesgo de invasión tisular y con previsión de respuesta a un tratamiento estándar corto (3 días). Ocurren en mujeres jóvenes en edad fértil, sanas y no embarazadas. En pacientes sintomáticos la presencia de más de  $10^3$  colonias/ml se considera significativa y debe instaurarse tratamiento antibiótico. Por otra parte, en pacientes asintomáticos la presencia sería significativa a partir de  $10^5$  colonias/ml en mujeres y a partir de  $10^4$  colonias/ml en hombres (Balouiri et al., 2016).

Cistitis es el término médico para denominar la inflamación de la vejiga. La causa más frecuente de inflamación es por una infección bacteriana y es cuando recibe el nombre de infección urinaria, aunque las cistitis pueden también aparecer como una reacción a determinados medicamentos, irritantes o como una complicación de otra enfermedad. Una infección en la vejiga puede ser dolorosa y molesta, y puede volverse un problema de salud grave si la infección se disemina a los riñones. En el caso de la cistitis bacteriana los antibióticos son el tratamiento seleccionado más frecuente, mientras que el tratamiento para otros tipos de cistitis depende de la causa de fondo.

En la web de *Mayo Clinic* aparecen los principales síntomas que la caracterizan (Equipo de Mayo Clinic, 2018): necesidad imperiosa y constante de orinar; sensación de ardor al orinar; orinar en pequeñas cantidades; sangre en la orina (hematuria); orina turbia y con olor fuerte; molestias pélvicas; sensación de presión en la parte inferior del abdomen y fiebre baja.

El espectro microbiano de la cistitis no complicada está compuesto por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como por ciertos hongos. El agente causante más común es *Escherichia coli* (75%-95%) (Gupta et al., 2011), seguida por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Enterococcus* spp. Otras bacterias como *Streptococcus* del grupo B (GBS), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* spp. raramente se aíslan en IU no complicadas, aunque puede ocurrir. (Flores-Mireles, Walker, Caparon, & Hultgren, 2015).



**Figura 1:** Epidemiología de las infecciones del tracto urinario. El agente causal más común para las IU complicadas y no complicadas es la *Escherichia coli* uropatógena (UPEC). Para las IU no complicadas, otros agentes causales son (en orden de prevalencia) *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* del grupo B (GBS), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* spp. (Flores-Mireles et al., 2015).

Aunque la infección del tracto urinario no suele considerarse una enfermedad asociada a brotes de toda la comunidad, ciertos linajes uropatógenos de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos han mostrado un comportamiento epidémico (Phillips et al., 1988).

## 1.2. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA ASOCIADA A CISTITIS

Tal y como define la OMS, la resistencia a los antimicrobianos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Es consecuencia de la capacidad de ciertos microorganismos como las bacterias de neutralizar o evadir el efecto de los antibióticos (Equipo de la OMS, 2018).

Existen dos tipos de resistencia. Por un lado, la resistencia natural o intrínseca es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, y se produce si las bacterias carecen de diana para un antibiótico determinado. Por otro lado, la resistencia adquirida es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria, y puede aparecer por mutaciones cromosómicas o por mecanismos de transferencia genética. Ésta última es la realmente importante desde el punto de vista clínico, y esta mediada por plásmidos, transposones o integrones (Daza, 1998). Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción. Encontramos fundamentalmente tres mecanismos de resistencia (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015):

- Inactivación enzimática del antibiótico hidrolizándolo o modificándolo, como es el caso de las *beta*-lactamasas. En este caso, la enzima elaborada por la bacteria inactiva a la molécula de la droga volviéndola incapaz de actuar.
- Minimización de la concentración intracelular de antibiótico ya sea por modificaciones bacterianas que impiden la llegada de éste al punto diana, como la impermeabilización de la membrana o la pared celular, o por la expulsión de los antibióticos por mecanismos activos.
- Modificación del sitio diana del antibiótico mediante mutaciones. En algunos casos hay una reducción de la afinidad del receptor por la molécula del antimicrobiano.

La resistencia a los antimicrobianos se ve facilitada por el uso inadecuado de los antibióticos, como por ejemplo para tratar infecciones víricas como el resfriado o la gripe, compartir el tratamiento con otros pacientes sin prescripción médica, la automedicación, o debido una duración o dosis incorrecta (Errecalde, 2004).

La cistitis aguda sigue siendo una de las indicaciones más comunes para la prescripción de antimicrobianos a mujeres sanas. A pesar de las directrices publicadas para la selección óptima de un agente antimicrobiano y la duración de la terapia, los estudios demuestran una amplia variación en las prácticas de prescripción. Los resultados potencialmente

negativos podrían incluir un diagnóstico o un tratamiento erróneo de enfermedades de transmisión sexual o pielonefritis como si fueran una IU no complicada, aumento de las recurrencias de ITU o fallos en el tratamiento, o el uso indebido de antibióticos para fines distintos al tratamiento de ITU.

Dado que los patrones de resistencia de las cepas de *E. coli* que causan IU no complicadas varían considerablemente entre las regiones y los países, una recomendación de tratamiento específico puede no ser universalmente adecuada. Los estudios de vigilancia activa de la susceptibilidad *in vitro* de los agentes uropatógenos en mujeres con cistitis no complicada son útiles para tomar decisiones sobre la terapia empírica. Cuatro grandes estudios informaron de la susceptibilidad *in vitro* de *E. coli* causante de IU no complicada en América del Norte y Europa: Kahlmeter & Poulsen (2012); Kahlmeter (2003); Naber, Schito, Botto, Palou, & Mazzei (2008); Zhanel et al. (2006). Todos ellos demuestran una considerable variabilidad geográfica en la susceptibilidad.

El aumento de la resistencia a los antibióticos se puede observar en los patógenos urinarios que causan infecciones tanto adquiridas en la comunidad como nosocomiales. En mujeres con infección urinaria aguda no complicada se ha demostrado una mayor resistencia a la ampicilina (21,2–34 %) (Kahlmeter & Poulsen, 2012), cefalotina (20%-30%) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) (15%-20%) por parte de las cepas de *Escherichia coli* causantes. En Estados Unidos y gran parte de Europa, la resistencia a la nitrofurantoína y a las fluoroquinolonas sigue siendo rara. Sin embargo, en otras partes del mundo, la resistencia a TMP puede llegar a ser del 50%, y las *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas no son infrecuentes en IU no complicadas. La resistencia a los antimicrobianos también se ha convertido en un problema creciente en ITUs complicadas y asociadas a catéter debido a la resistencia a TMP-SMX y fluoroquinolonas entre *E. coli* y otras enterobacterias, así como la resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en bacterias Gram-negativas y en enterococos resistentes a la vancomicina (Stamm & Norrby, 2001).

En el caso concreto de la cistitis no complicada, el agente etiológico más frecuente es *E. coli* y la menor resistencia antimicrobiana la presentan fosfomicina (0–2.9%) y nitrofurantoína (0–4.4%) (Tandogdu & Wagenlehner, 2016). Es por eso que estos dos antibióticos se recomiendan para uso habitual. Por otra parte, el uso empírico de cotrimoxazol está restringido a regiones con una resistencia menor al umbral del 20% y en casos que no hayan usado este antibiótico en los últimos 3 meses. Si se conoce la susceptibilidad local o se dispone del resultado del urocultivo, tanto el cotrimoxazol,

como ciprofloxacino son excelentes alternativas. El uso de amoxicilina/ác. clavulánico o cefpodoxima son de menor efectividad en el uso empírico y no se recomiendan (Durán, 2018). Ver *Tabla 1* en **ANEXO 1**.

Este aumento de la resistencia a los antimicrobianos entre los patógenos urinarios que causan la cistitis aguda, ha aumentado consiguientemente la sensibilización de la población frente a la importancia de una correcta terapia antimicrobiana. Es por eso que en estos últimos años ha habido un incremento de estudios dirigidos a la búsqueda de agentes nuevos, de diferentes pautas terapéuticas, y con cohortes de mujeres con uropatógenos resistentes a los tratamientos convencionales (Gupta et al., 2011).

### **1.3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LAS INFECCIONES URINARIAS**

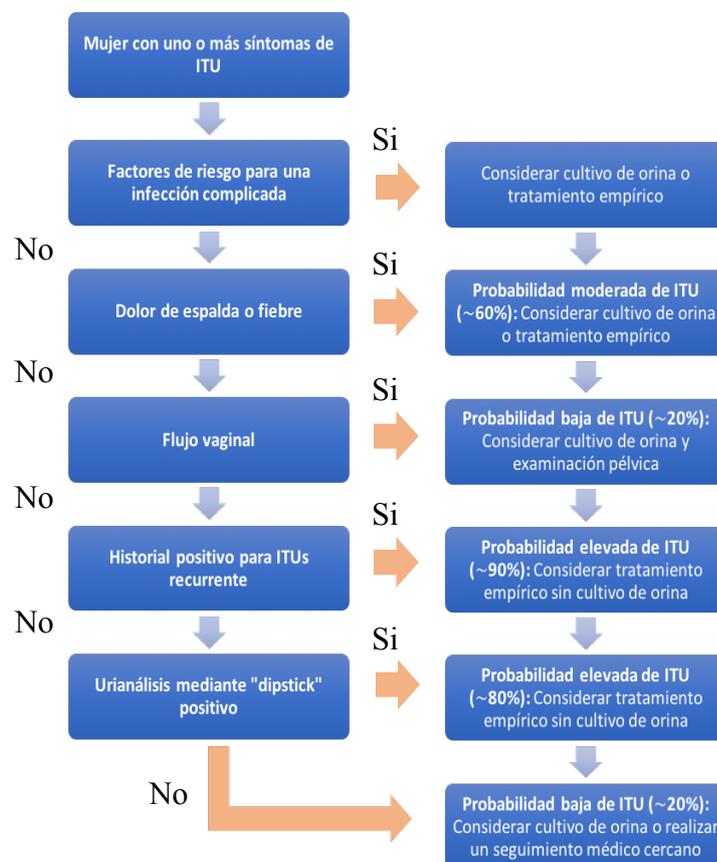
Las ITU son desafiantes, no solo por la gran cantidad de infecciones que ocurren cada año, sino también porque su diagnóstico no siempre es sencillo. Los médicos deben distinguir la IU de otras enfermedades que tienen una presentación clínica similar, algunas IU son asintomáticas o presentan signos y síntomas atípicos, y el diagnóstico de ITU en pacientes neutropénicos (que no suelen tener piuria) puede requerir diferentes criterios de diagnóstico que los utilizados para la población general. Debido a estos factores, los médicos con frecuencia dependen de un pequeño número de pruebas de laboratorio para aumentar las impresiones clínicas; incluso cuando los diagnósticos clínicos son inequívocos, los médicos pueden ordenar pruebas de laboratorio para identificar la causa de la infección y/o proporcionar aislamientos para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Por lo tanto, no es una sorpresa que el examen de laboratorio de muestras de orina represente una gran parte de la carga de trabajo en muchos laboratorios hospitalarios. De hecho, en muchos laboratorios clínicos, los cultivos de orina son el tipo más común de cultivo, representando el 24% - 40% de los cultivos enviados (Pappas, 1991).

El diagnóstico perfecto se basa en la presencia de síntomas sistémicos o localizados junto con un cultivo de orina positivo, pero generalmente no se dispone del resultado del cultivo de orina para guiar el diagnóstico. Hay varios estudios que debaten sobre el valor añadido del cultivo de orina en la eficacia del tratamiento de las cistitis en la práctica clínica. Por ejemplo, Bent, Nallamotheu, Simel, Fihn, & Saint (2002) observaron que las mujeres que presentaban al menos 2 síntomas de ITU (disuria, urgencia o frecuencia) tenían una probabilidad mayor del 90% de tener cistitis aguda. El hecho de realizar pruebas

adicionales como una tira reactiva de orina para la esterasa leucocitaria no mejoraba la probabilidad de que se tratase de una infección verdadera. En otro estudio, la obtención de una muestra de orina para las pruebas con tira reactiva o cultivo en mujeres con síntomas de cistitis aguda, no se asoció con beneficios en el control de los síntomas en comparación con la terapia empírica inmediata (Little et al., 2010). Por lo tanto, una visita al consultorio sin un cultivo de orina es una estrategia de tratamiento aceptable para la cistitis aguda.

De esta forma, el cultivo microbiológico de orina está considerado únicamente para mujeres con recaídas o infecciones recurrentes, con infecciones complicadas o aquellas en las que se sospecha la presencia de microorganismos resistentes. También se pueden considerar otros enfoques para tratar la cistitis aguda sin un cultivo de orina, entre ellos se incluye el tratamiento telefónico y el tratamiento iniciado por el propio paciente.

Dada la alta incidencia de cistitis aguda y la alta tasa de recurrencia, un enfoque simplificado para el diagnóstico y el tratamiento de las cistitis sería muy atractivo tanto para los pacientes como para los médicos (Grigoryan, Trautner, & Gupta, 2014).



**Figura 2:** Algoritmo propuesto para evaluar a mujeres con síntomas de ITU. Diseñado a partir del esquema de Bent et al. (2002).

Para aquellos casos más complejos en los que se ha comentado que sería necesario obtener una muestra de orina del paciente, encontramos dos tipos de diagnóstico en función de si se hace o no un cultivo microbiológico de la orina.

### 1.3.1. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CELULAR

Consisten esencialmente en la detección de bacteriuria (presencia de bacterias en la orina) i piuria (presencia de neutrófilos en la orina) como indicadores de infección bacteriana. Ambos métodos se pueden encontrar integrados en el llamado *dipstick test*, que se utiliza para determinar algunos de los cambios patológicos que pueden detectarse a partir de la orina de un paciente. Éstos consisten en una cinta de material plástico o de papel, de aproximadamente 5 milímetros de ancho, que constan de unas almohadillas impregnadas de sustancias químicas que reaccionan con los compuestos presentes en la orina produciendo un color característico. Este análisis abarca pH, presencia de proteína, glucosa, cetonas, hemoglobina, bilirrubina, urobilinógeno, nitrito, leucocitos y densidad (Strasinger & Di Lorenzo, 2010).

### 1.3.2. MÉTODOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

El cultivo bacteriano de orina puede no ser necesario como parte de la evaluación de pacientes con IU no complicadas (Bent et al., 2002; Little et al., 2010). Sin embargo, los cultivos de orina son necesarios en pacientes que tienen IU recurrentes, han experimentado fallos en el tratamiento o en ITU complicadas. Los cultivos de orina también son necesarios para los pacientes hospitalizados que desarrollan IU. El cultivo bacteriano sigue siendo una prueba importante en el diagnóstico de ITU, no sólo porque ayuda a confirmar la infección, sino también porque es necesario para determinar la identidad del microorganismo causante y para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Esto es particularmente importante debido a la mayor incidencia de infecciones urinarias producidas por bacterias con resistencia a los antimicrobianos de uso rutinario. El criterio más utilizado para definir la bacteriuria significativa es la presencia de  $10^5$  UFC/ml de orina, o superior. Este criterio se estableció solo para mujeres con pielonefritis aguda o mujeres que eran asintomáticas pero que tenían múltiples cultivos de orina que contenían este número de bacterias (Pappas, 1991). Sin embargo, la mayoría de los pacientes con ITU no entran en esta categoría y, entre el 30 y el 50% de los pacientes con síndrome uretral agudo cuentan con recuentos de colonias inferiores a  $10^5$  UFC/ml (Stamm et al., 1982). Por este motivo, muchos laboratorios han optado por

utilizar recuentos de colonias más bajos ( $10^2$  UFC/ml) como criterio para interpretar y reportar los resultados (Wilson & Gaido, 2004). Existen diversos tipos de cultivo para la detección de bacterias aeróbicas y anaeróbicas y hongos.

Por otra parte, cada laboratorio debe tener unas pautas por las cuales los patógenos son testados para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Estos tests deben realizarse e informarse de acuerdo con la versión más reciente de las directrices NCCLS. Sólo un número limitado de ellos han sobrevivido a la maduración de la microbiología clínica de diagnóstico moderna, como el método de difusión en disco y la prueba de microdilución en caldo, que ha alcanzado el estado estándar de referencia al que todos los demás métodos de susceptibilidad antimicrobiana se comparan actualmente (Van Belkum & Dunne, 2013). Las principales limitaciones de estos métodos incluyen el requerimiento de un número relativamente grande de organismos viables, procesamiento pre-analítico complicado, variabilidad analítica, tiempo de obtención de resultados y el coste.

Ver *Tabla 2* en **ANEXO 2**.

### 1.3.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Aunque los enfoques de diagnóstico molecular se están aplicando al diagnóstico de muchas infecciones, las ITU todavía se diagnostican generalmente por otros métodos como el cultivo de orina. A pesar de que como hemos visto éstos presentan diversas limitaciones. Es por eso que el cuidado del paciente podría beneficiarse en gran medida del desarrollo de una prueba rápida, precisa y de bajo coste que permitiría al médico decidir si es necesario tratar, y con qué. Tal prueba tendría el potencial no solo de diagnosticar una ITU como la cistitis, sino también de disminuir el uso innecesario de antimicrobianos reduciendo así la aparición de resistencias (Stamm & Norrby, 2001).

El concepto de “diagnóstico molecular” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular para la detección y/o cuantificación de secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN). Entre las técnicas más importantes están la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que puede ser cualitativa o bien las cuantitativas o a tiempo real (PCRrt), y la hibridación *in situ*.

En la siguiente tabla podemos observar las ventajas y los inconvenientes de las técnicas de diagnóstico comentadas hasta ahora y de las técnicas de diagnóstico molecular, incluyendo nuestra tecnología. Ver *Tabla 3* en **ANEXO 3**.

#### 1.4. NUEVAS TECNOLOGÍAS MICROFLUÍDICAS BASADAS EN *LAB-ON-A-CHIP* (LOC)

Los *Lab-On-a-Chip* son dispositivos miniaturizados que permiten llevar a cabo diversos ensayos, realizados comúnmente en un laboratorio, de manera controlada y automatizada empleando volúmenes de muestra y reactivos muy pequeños. Las ventajas de estos dispositivos se derivan de la manipulación de reactivos en la microescala, e incluyen una mayor sensibilidad, una reducción de los costes y un aumento en la velocidad de los ensayos. Además, también permiten minimizar la generación de residuos y la exposición a productos químicos peligrosos, resultando así muy atractivos desde el punto de vista medioambiental.

Algunos dispositivos diseñados usando principios básicos de escalado están ahora disponibles comercialmente, y continúan surgiendo nuevas tecnologías para miniaturizar nuevos sistemas analíticos cada vez más complejos con los que realizar ensayos elaborados, como es el caso de las reacciones biológicas (Janasek, Franzke, & Manz, 2006).

La mayor parte de estos dispositivos *lab-on-a-chip* se basa en tecnología microfluídica. El término microfluídica se refiere a la manipulación de fluidos en canales con dimensiones de decenas de micrómetros, donde los fluidos tienen un comportamiento diferente al observado en la macroescala. Las primeras aplicaciones de las tecnologías microfluídicas han sido en análisis, para las cuales ofrecen varias capacidades útiles: usar cantidades muy pequeñas de muestras y reactivos, realizar separaciones y detecciones con alta resolución y sensibilidad, bajo coste, tiempos cortos de análisis, etc. (Whitesides, 2006).

La microfluídica explota su pequeño tamaño, que es su característica más evidente, pero también explota características menos obvias de los fluidos en los microcanales, como la generación de flujo laminar. Éste sólo permite la mezcla de fluidos por difusión, en cambio, en sistemas turbulentos intervienen otros procesos (DeMello, 2006).

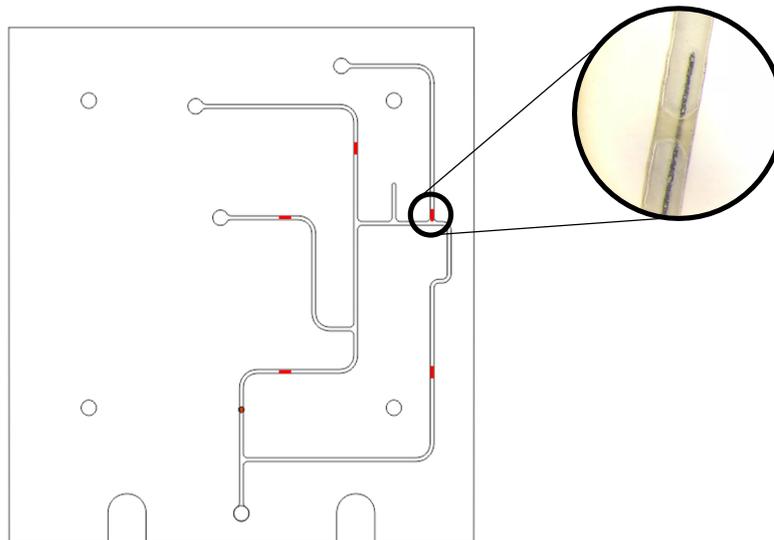
Los primeros trabajos en microsistemas fluídicos utilizaron silicio y vidrio, pero estos materiales han sido desplazados en gran parte por los materiales poliméricos.

Por lo tanto, los dispositivos microfluídicos no se han desarrollado como clones de dispositivos microelectrónicos de silicio, sino que gran parte de la investigación exploratoria en sistemas microfluídicos se ha llevado a cabo en un polímero llamado polidimetilsiloxano o PDMS. Se trata de un elastómero ópticamente transparente que

proporciona facilidad a la hora de probar nuevos conceptos y capacidad para definir componentes fluidicos variados (como por ejemplo válvulas) (Whitesides, 2006). Posteriormente se han utilizado otros materiales como el PSA (*pressure sensitive adhesive film*) para el desarrollo de sistemas microfluídicos.

Un sistema microfluídico debe tener una serie de componentes genéricos:

- a) Un método de introducción de reactivos y muestras (como fluidos), los llamados *inlets*. Y un método de salida de reactivos, llamado *outlet*.
- b) Métodos para mover estos fluidos alrededor del chip y para combinarlos y mezclarlos, como por ejemplo válvulas.
- c) Otros dispositivos: detectores para los trabajos microanalíticos y componentes para la purificación de productos.

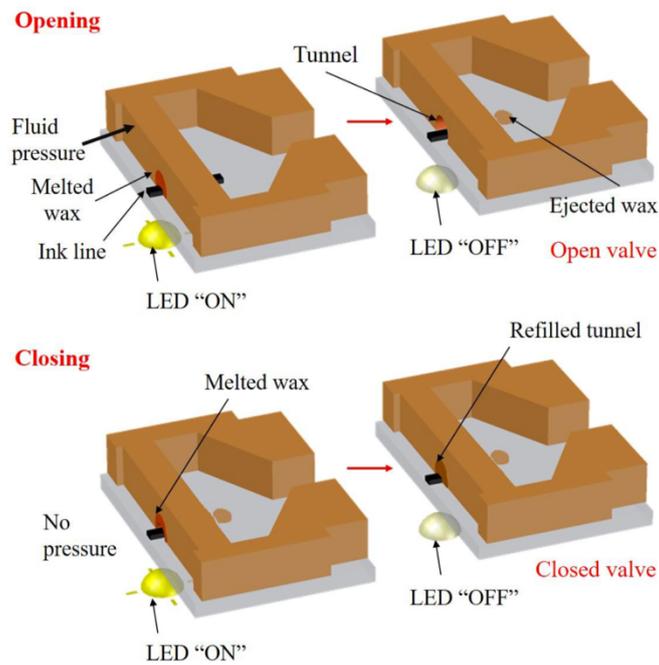


**Figura 3:** Ejemplo del esquema de un chip microfluídico. En rojo podemos observar, con forma rectangular, las distintas válvulas que lo forman y su imagen ampliada; y con forma circular, el punto en el que se realiza la detección. Además, también se pueden apreciar los canales con sus *inlets* en los extremos y un *outlet*.

Dos contribuciones particularmente importantes para estos componentes han sido: el desarrollo del método de impresión suave en PDMS como método para fabricar prototipos, y el desarrollo de un método simple de fabricación de válvulas, mezcladores y bombas. Estos métodos han permitido fabricar dispositivos prototipo que prueban nuevas ideas en un período de tiempo récord de menos de 2 días desde el diseño del dispositivo hasta su funcionamiento (Whitesides, 2006).

Por lo tanto, las válvulas son un componente clave para el control del flujo de fluidos, y su integración en el sistema microfluídico ha sido un foco importante de investigación. La mayoría de las válvulas creadas hasta ahora utilizan membranas modificadas por una variedad de actuadores (térmicos, magnéticos, eléctricos, neumáticos, etc.) para el control de fluidos en el chip. La principal limitación de este tipo de válvulas es la necesidad de componentes de accionamiento externos voluminosos y que consumen mucha energía para su accionamiento. Un ejemplo son las válvulas de PDMS, que han sido de lejos el tipo más reportado de microválvulas integradas (Unger, Chou, Thorsen, Scherer, & Quake, 2000). Aunque menos reportadas, otras alternativas serían las microválvulas enchufables basadas en el uso de geles poliméricos de respuesta a estímulos (Eddington & Beebe, 2004) y materiales de cambio de fase (ceras de parafina) (Ogden, Klintberg, Thornell, Hjort, & Bodén, 2014). Aun así, su aplicación se ve limitada debido a su lenta cinética y debilidad mecánica, entre otros. Debido a los distintos problemas que presentan las válvulas comentadas anteriormente, un grupo de investigadores (Díaz-González, Boix, Fernández-Sánchez, & Baldi, 2017) han desarrollado recientemente microválvulas de cera controladas eléctricamente que superan todas estas limitaciones.

Para el funcionamiento de estas microválvulas se empleó una película de transparencia de poliéster colocada justo debajo de la capa en la que se encuentran las válvulas. Esta película lleva impresas líneas de tinta negra que serán requeridas para la actuación de las válvulas. La estructura básica de una válvula comprende una barrera de cera que bloquea el canal y la línea de tinta negra impresa mencionada que sobresale en ambos lados de la barrera, y funciona como un calentador fototérmico. Un LED blanco ubicado debajo de la válvula se usa como fuente de luz para la actuación de la misma. La válvula está diseñada para abrirse cuando se aplica una diferencia de presión a través de la barrera y para cerrarse cuando no hay presión en el sistema. Tanto la apertura como el cierre de la válvula se producen cuando la cera se derrite por el calor liberado por la línea de tinta impresa, justo después de que esta haya sido irradiada por el LED. Durante la apertura de la válvula, la cera en contacto con la línea impresa se derrite y es expulsada de la barrera, dejando así un pequeño túnel. El cierre se realiza a presión cero a través de la barrera, de modo que cuando el LED se active, la cera alrededor del calentador fototérmico se derretirá y rellenará el túnel. Una vez se apaga el LED, la cera se solidifica y la válvula permanece permanentemente cerrada (Díaz-González et al., 2017).



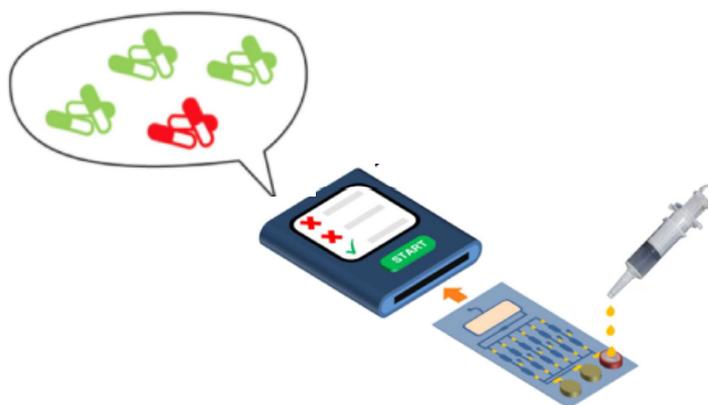
**Figura 4:** Representación esquemática del mecanismo de apertura y cierre de la válvula de cera. Para abrir la válvula, el LED se activa mientras se aplica una diferencia de presión a través de la barrera. La cera en contacto con la línea del calentador de tinta se derrite y expulsa de la barrera formando un pequeño túnel. Para cerrar la válvula, el LED se activa durante más tiempo y la cera alrededor de la línea del calentador se derrite y rellena el túnel (Díaz-González et al., 2017).

Referente a la salud pública, la tecnología LOC representa una parte muy importante de los esfuerzos para mejorarla, particularmente a través del desarrollo de dispositivos basados en *point-of-care testing*. Estos dispositivos consisten, por ejemplo, en pruebas para agilizar el diagnóstico de infecciones de orina en el punto de atención al paciente. De este modo, el médico sabe en poco tiempo si el paciente está sufriendo una infección bacteriana y, en cuyo caso, con que antibiótico específico tratarla. Esto resulta muy interesante ya que permitiría una importante descentralización de muchas de aquellas muestras que no pueden ser analizadas en el mismo centro médico en el que se han tomado. Es por eso que existe una gran necesidad de crear chips microfluídicos que permitan a los proveedores de servicios de salud realizar pruebas de diagnóstico como inmunoensayos y análisis de ácidos nucleicos sin soporte de un laboratorio especializado (Price, 2001).

## 2. OBJETIVOS

El presente Trabajo de Final de Máster consiste en una colaboración dentro del proyecto *Res-Kit*, un proyecto coordinado en el que participan investigadores del Instituto de Microelectrónica de Barcelona (CSIC), de la Facultad de Veterinaria de la UAB y del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA-IRTA). El proyecto se basa en el diseño de un kit *pen-site* para la detección *in situ* de genes de resistencia antimicrobiana. Debido a las limitaciones que tienen las técnicas de diagnóstico actuales para la detección y tratamiento de las cistitis, este kit permitirá seleccionar de forma más rápida, barata, individualizada y en el mismo punto de obtención de la muestra (*in situ*), el tratamiento antibiótico más adecuado para tratar esta infección.

En un futuro, el prototipo final del Res-kit consistirá en un dispositivo *pen-site* que detectará cuando una bacteria causante de cistitis posee un gen de resistencia a la familia de antibióticos que estemos analizando. Para ello, lo único que deberemos hacer será añadir una gota de orina en la obertura del dispositivo. Esta gota será procesada para extraer el material genético de las células presentes para posteriormente realizar el análisis de este material genético, todo ello realizado en el interior del kit.



**Figura 5:** Prototipo final del *Res-kit*: dispositivo point-of-care basado en simple-in-answer-out con sistema automatizado de preparación de muestra y detección de resistencias a antibióticos.

El objetivo general de este trabajo se centra en la realización de una prueba de concepto de una tecnología microfluídica que se aplicará para el desarrollo del kit.

Los objetivos específicos son:

- La puesta a punto de un protocolo de un ensayo de DNA sobre microesferas.
- Su implementación en un dispositivo microfluídico en el que poder realizar el ensayo de forma automatizada.

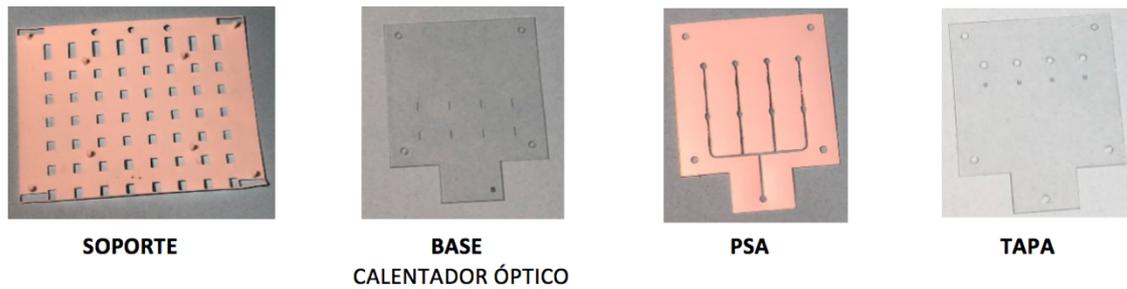
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DISEÑO, FABRICACIÓN Y MONTAJE DE UN CHIP MICROFLUÍDICO

El microchip está constituido por una serie de capas alineadas entre ellas siguiendo un orden específico. Entre los materiales que forman estas capas encontramos PSA y transparencias. Para diseñar los distintos elementos que constituyen el chip (canales, válvulas, *inlets*, *outlets*...) se utiliza el software de diseño Corel Draw X7. Mediante la *Grabadora láser Epilog Mini 24 (Epilog Laser)*, estos elementos se imprimirán en la capa que corresponda.

Las capas y otros elementos necesarios para el montaje del chip se encuentran descritas a continuación:

- **Soporte de alineamiento:** soporte que utilizaremos como guía para el montaje del chip. Éste posee 4 pivotes que forman un cuadrado para alinear cada una de las capas del chip de forma precisa.
- **Capa base:** capa de polyester transparente que conforma la base del chip. En ella se imprimen unas líneas con tinta negra que se utilizarán como calentadores ópticos, es decir, la energía generada por un LED va a calentar estas líneas de forma que transmitirán el calor a la cera situada justo encima. De esta forma vamos a abrir y cerrar las válvulas de cera.
- **Capa PSA:** capa adhesiva de doble cara compuesta por dos capas protectoras y la capa de PSA. En ella imprimiremos los distintos elementos que caracterizarán cada chip (canales, válvulas, *inlets/outlets*, etc.). Para la impresión utilizaremos aquellos parámetros de corte necesarios para que solo se corten las dos primeras capas del PSA (una capa protectora y el mismo PSA).
- **Capa tapa:** capa de polyester transparente que se colocará en la parte superior del chip, justo encima de la capa de PSA. En ella encontramos los agujeros correspondientes a los distintos *inlets* y *outlets*.



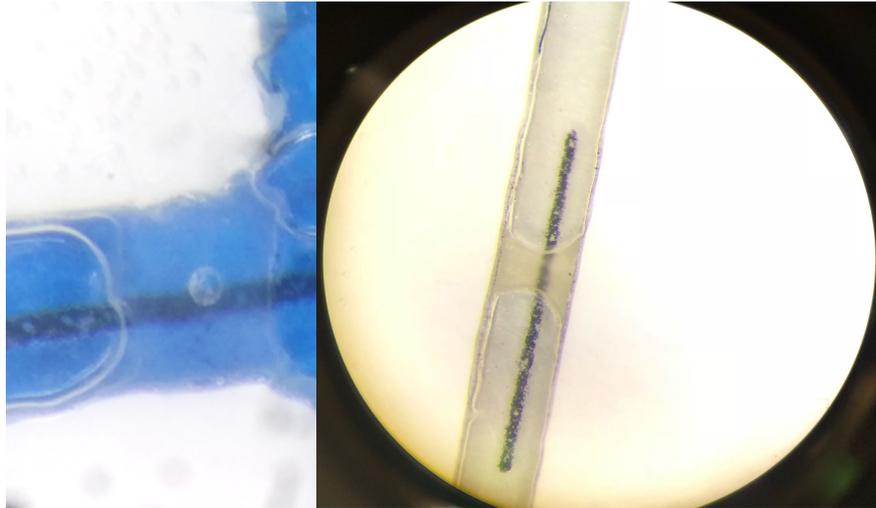
**Figura 6:** Imágenes del soporte que se han utilizado para la formación del microchip y las tres capas que lo forman. De izquierda a derecha observamos el soporte, la base, el PSA y la tapa.

Antes de montar el chip, lavaremos las transparencias con agua y jabón para eliminar los residuos que deja el láser. Seguidamente, colocaremos la base, con las líneas del calentador óptico impresas hacia arriba, sobre la plantilla de alineamiento. Para la impresión de estas líneas utilizaremos una impresora de tóner.

La siguiente capa a colocar es la de PSA. Para poder formar las válvulas primero tenemos que recortar, con la ayuda de un cúter, los espacios donde las vamos a colocar. Una vez hecho esto, vamos a remover la capa de PSA de los canales y a quitar la capa protectora superior para poder pegar el PSA a la base. Es muy importante que los espacios para las válvulas queden bien alineados con las líneas de los calentadores ópticos. Apretaremos bien, asegurándonos de que la base y el PSA quedan bien pegados.

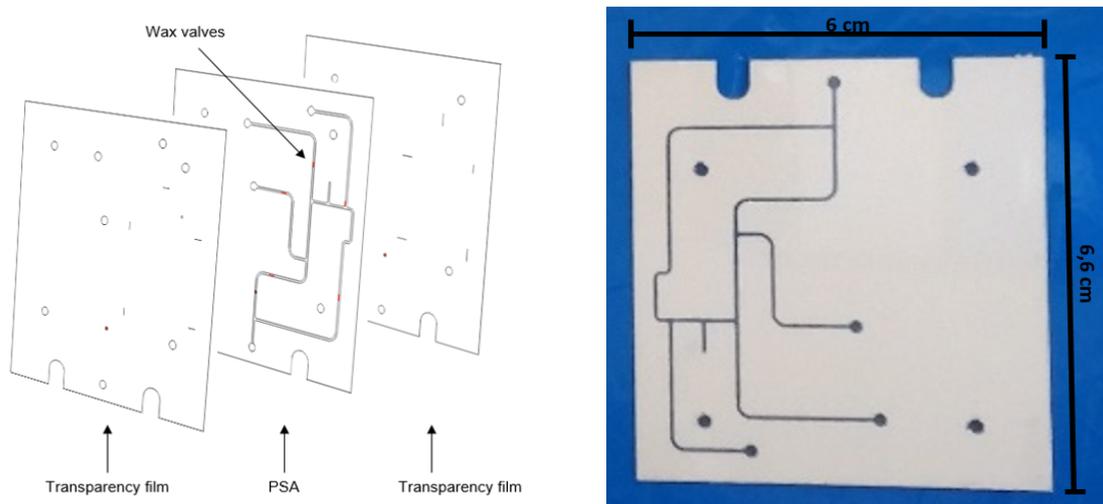
Es en este momento en el que procedemos a la dosificación manual de la cera en estos espacios que habíamos vaciado por completo (agujereando las tres capas de PSA con el cúter). Éstas, se han formado probando dos tipos de cera para ver cuál de ellas daba mejor resultado. Por un lado, se ha utilizado cera natural de abeja obtenida de una tienda local de fabricación de velas, y por otro se ha utilizado cera microcristalina comercial proporcionada por *Iberceras Specialties S.L.U.*

A continuación, removemos la segunda capa protectora del PSA y colocamos la tapa apretando bien para asegurarnos de que quedan bien pegadas, especialmente en la zona de las válvulas y los canales para que no tengamos fugas.



**Figura 7:** Imágenes tomadas al microscopio de dos válvulas formadas con los dos tipos distintos de cera. A la izquierda podemos observar una válvula transparente de cera microcristalina; y a la derecha observamos una válvula, más amarilla, hecha con cera natural de abeja.

El último paso consiste en la formación de meniscos en las válvulas. Estos meniscos los formaremos colocando el chip encima de una placa calefactora durante unos 20-25 segundos a 65°C en el caso de la cera de abeja, y 20-25 segundos a 81°C en el caso de la cera comercial. Comprobamos bajo el microscopio que los meniscos se han formado correctamente.



**Figura 8:** A la izquierda observamos un esquema de las capas que forman el chip (base, PSA y tapa) con las válvulas marcadas en rojo en el PSA. A la derecha podemos observar una fotografía del chip con las medidas indicadas en centímetros.

## 3.2. ENSAYOS CON ADN

### 3.2.1. FUNCIONALIZACIÓN DE ESFERAS

Como nuestro objetivo es realizar el ensayo de hibridación dentro de un microchip, el soporte de inmovilización del ADN *target* tiene que ser pequeño y móvil. Es por eso que se han escogido las microesferas carboxiladas Polybead® de 20  $\mu\text{m}$  al 2,5% en agua, que son microesferas de poliestireno monodispersas que contienen grupos carboxilo en la superficie. Estos grupos carboxilos de la esfera se unirán a los grupos amino de la hebra de captura mediante el *cross-linker* EDC. La hebra de captura es la que va a permitir inmovilizar posteriormente la hebra *target* a la esfera, puesto que son complementarias entre ellas. Además, estas esferas son responsables de generar una relación superficie-volumen total (*surface-to-volume-ratio*) elevada, creando una mayor superficie expuesta para reaccionar, acelerando la velocidad con la que ocurren las reacciones.

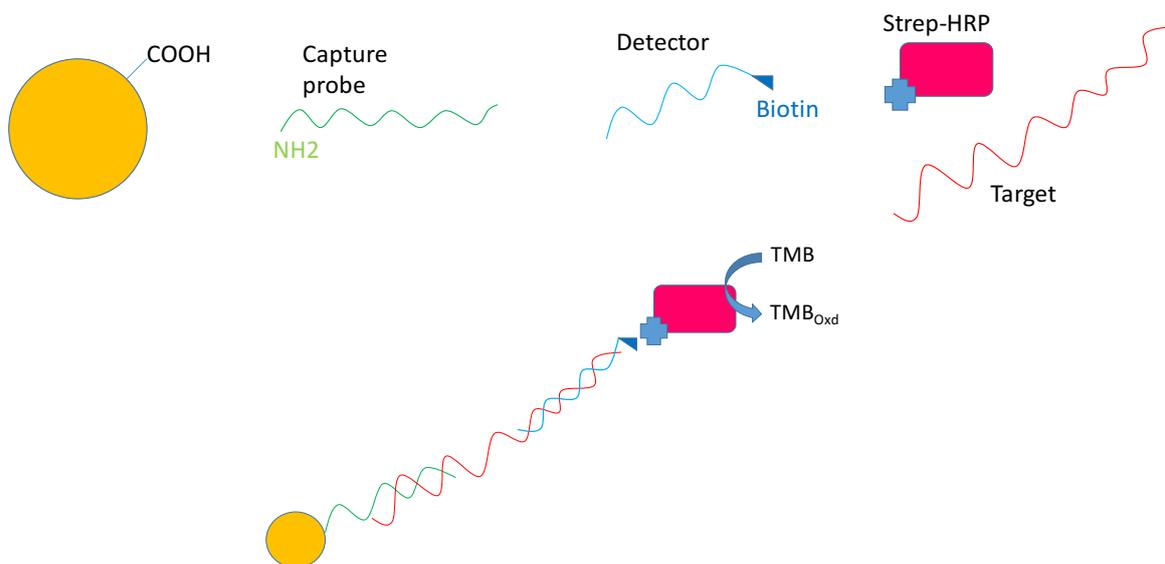
Para comprobar que la funcionalización de las esferas con la hebra de captura es adecuada, uniremos hebras de captura biotinizadas a las esferas. Estas hebras formarán un enlace de alta afinidad con el conjugado estreptavidina-HRP y observaremos el cambio de color mediante la reacción enzimática con el sustrato TMB. Para asegurarnos de que el TMB reaccionado se debe exclusivamente al HRP unido a las hebras de captura que se han adherido a las esferas, lo que haremos será realizar lavados para limpiar el TMB que no se haya unido. Además, previamente habremos bloqueado las esferas con PBS Tween 1% BSA para evitar uniones inespecíficas.

Durante la realización del ensayo se han empleado distintos buffers para mantener estable un determinado pH y favorecer así cada uno de los distintos pasos. Cada vez que se cambia de un buffer a otro tendremos que realizar lavados.

- MES  $\rightarrow$  acondicionamiento de esferas para favorecer la unión esfera-hebra de captura.
- PBS 0,05% Tween  $\rightarrow$  surfactante para limpiar y evitar que se aglomeren las esferas.
- PBS 0,05% Tween 1% BSA  $\rightarrow$  bloqueo de superficies (esferas y eppendorfs donde se desarrollan los ensayos).
- Citrato  $\rightarrow$  dotar del pH óptimo para la reacción enzimática con el sustrato TMB.

Además, mediante la repetición de este primer ensayo, hemos podido establecer las concentraciones óptimas de cada uno de los compuestos que intervienen (esferas, EDC, hebra de captura y estreptavidina-HRP) y que serán utilizadas en los siguientes ensayos.

### 3.2.2. ENSAYO DE HIBRIDACIÓN TIPO SÁNDWICH



**Figura 9:** Esquema de los distintos elementos utilizados para realizar el ensayo de hibridación tipo sándwich con ADN.

Para el ensayo tipo sándwich utilizaremos tres hebras de ADN distintas: *probe* (30 bases), *target* (60 bases) y *detector* (30 bases). El primer paso es la funcionalización mediante EDC de las esferas con la hebra de captura, esta vez no biotinilada. Estas esferas funcionalizadas hibridarán con la hebra *target*, que tiene 60 bases. 30 de estas bases son complementarias a la hebra de captura (primera hibridación), y las otras 30 a la detectora (segunda hibridación). En este ensayo será la hebra detectora la que esté biotinilada, permitiendo la unión del compuesto estreptavidina-HRP responsable de la detección. Con el objetivo de hallar el límite de detección del ensayo, éste se ha realizado con distintas concentraciones de hebra *target*.

El experimento de hibridación se ha llevado a cabo en dos días. En el primer día se realiza la modificación de las esferas carboxiladas con la hebra de captura y también un bloqueo de las esferas para evitar uniones inespecíficas. Y en el segundo día se llevan a cabo las hibridaciones de las tres hebras, la unión de la marca (HRP) y la posterior lectura en el lector ELISA. Ver protocolo detallado en **ANEXO 4**.

### 3.2.3. ENSAYO TIPO SÁNDWICH CON LECTURA ON-CHIP

De ahora en adelante todo aquel ensayo que sea realizado parcial o totalmente en el interior del chip lo llamaremos “on-chip”, mientras que aquellos ensayos realizados de forma convencional, o fuera del chip, los llamaremos “off-chip”.

Para determinar la capacidad de leer un resultado con el chip, hemos realizado un ensayo tipo sándwich off-chip y hemos leído los resultados dentro de éste registrando la intensidad de luz mediante un fotodetector, además de utilizar el lector ELISA. Esto posibilita poder comparar ambas lecturas para demostrar cual es más eficiente.

Para llevarlo a cabo se han utilizado chips con seis canales para poder realizar el ensayo con distintas concentraciones de hebra target y así determinar la curva de concentración vs absorbancia que dibujan las seis muestras utilizadas (5 nM, 0.5 nM, 0.15 nM, 0.05 nM, 0.015 nM, 0.005 nM). Cada canal es independiente y solo presenta un *inlet* para introducir los reactivos y una válvula para realizar la incubación con el TMB. El punto de detección se irá moviendo a cada uno de los canales para que éste no sea común para todas las concentraciones y así evitar interferencias.

Se realiza todo el ensayo fuera del chip hasta la unión de la estreptavidina-HRP a la hebra detectora biotinilada. Una vez llegados a este punto, introduciremos las esferas en el chip a través del *inlet* correspondiente. Mediante la apertura parcial de la válvula y aplicando presión negativa con una jeringuilla, acumularemos las esferas en la válvula, lugar en el que reaccionarán con TMB. Seguidamente, limpiaremos con cuidado el *inlet* para evitar la entrada de aire y añadiremos el TMB. El sustrato enzimático circulará por los canales mediante presión negativa, de modo que llegará al detector y producirá señal. Esta señal equivale al TMB no reaccionado (o limpio), necesaria para compararlo con el valor obtenido después de dejar reaccionar el TMB con las esferas durante 5 minutos.

Una vez obtenido el valor de lectura correspondiente para cada concentración de hebra *target*, se podrá comparar con el valor de lectura en el lector ELISA.

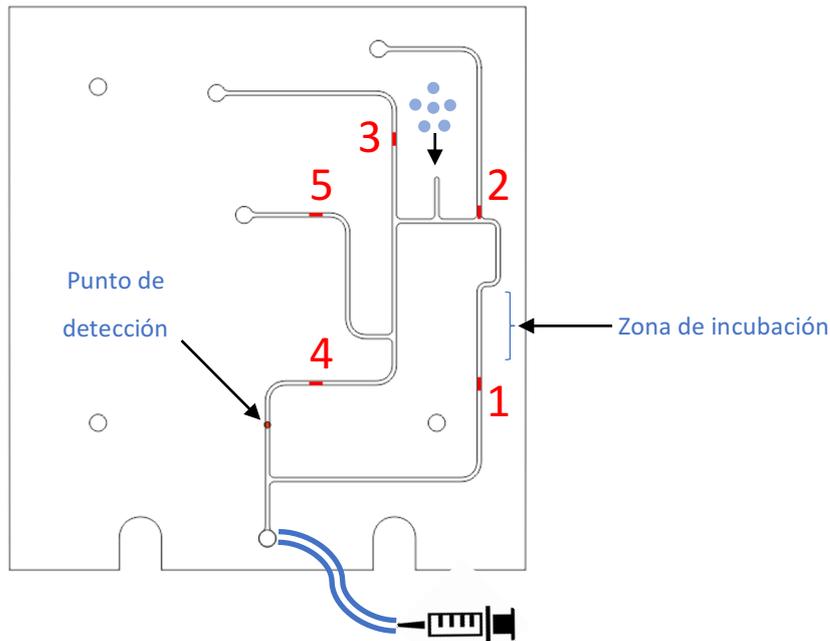
#### 3.2.4. ENSAYO TIPO SÁNDWICH COMPLETO ON-CHIP

Una vez comprobada la posibilidad de leer los resultados en el interior del chip, pasamos a realizar la totalidad del ensayo tipo sándwich en su interior. El único paso que realizamos fuera es la funcionalización de las esferas con la hebra de captura y el posterior bloqueo con PBST 1% BSA.

Para el ensayo on-chip, en primer lugar, tenemos que bloquear todos los canales del chip para evitar que los distintos elementos que introducimos se adhieran a estos. Para ello, llenaremos todo el chip con PBST 1% BSA abriendo de forma secuencial todas las válvulas mientras aplicamos presión negativa. La válvula nº1 será la última que abriremos, y la mantendremos abierta puesto que las esferas se acumularan en ella en el primer paso del ensayo.

- Introduciremos las esferas a través del *inlet* señalado en la *Figura 10* por una flecha con esferas. Tras depositar la solución de esferas aplicaremos presión negativa con la jeringuilla para acumular las esferas en la válvula nº1.
- Una vez acumuladas allí, taparemos el *inlet* de las esferas con cinta adhesiva y abriremos la válvula nº2, mediante la cual introduciremos los buffers para los lavados, las hebras *target* y detectora y la estreptavidina-HRP.
- Siguiendo el protocolo *off-chip*, haremos un lavado con PBST seguido de otro utilizando 2XSCC. Luego añadiremos la hebra *target* dejándola incubar durante 30 minutos.
- Finalizado este tiempo volveremos a lavar con 2XSCC y añadiremos la hebra detectora dejándola incubar otros 30 minutos.
- Lavaremos con 2XSCC y PBST y luego añadiremos la estreptavidina-HRP incubándola durante 1 hora.
- Volveremos a lavar con PBST y finalmente con citrato, medio que nos proporcionará el pH óptimo para favorecer la reacción enzimática.
- Una vez finalizadas las limpiezas, cerraremos la válvula nº2 y abriremos la válvula nº3. Entonces desplazaremos las esferas hasta la válvula nº3 aplicando presión positiva. Este paso lo haremos para poder cerrar la válvula nº1 y abrir la válvula nº4.
- Con las válvulas nº3 y nº4 abiertas parcialmente, aplicaremos presión negativa para acumular las esferas en la válvula nº4.
- Ahora cerraremos la válvula nº3 y abriremos la válvula nº5, por la cual introduciremos el TMB.
- Una vez llenado el canal con TMB, sacaremos la jeringuilla para que no ejerza presión y así poder incubar el TMB con las esferas entre 5 y 15 minutos. Pasado este tiempo volveremos a conectar la jeringuilla y aplicaremos presión negativa para que el TMB reaccionado pase por el detector y obtengamos señal.

Para que la señal obtenida sea significativa, previamente habremos hecho pasar TMB sin reaccionar por el detector. Obteniendo así el valor del TMB fresco.



**Figura 10:** Esquema del chip microfluídico utilizado para la realización del ensayo tipo sándwich completo on-chip. En él observamos los distintos elementos comentados anteriormente que forman el chip, como las válvulas, numeradas del 1 al 5. Además, también aparece la jeringuilla con la que ejercemos presión y las microesferas, representadas como esferas de color azul.

### 3.3. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENES DE RESISTENCIA

Todos los experimentos anteriores han sido realizados utilizando como secuencia target al siguiente oligonucleótido de ADN de 60 bases:

5' ATGTGCAGCACCCAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAA 3'

Se trata de una secuencia que consiste en un gen de resistencia a cefalosporinas, concretamente se trata del gen CTX-M-1 que codifica para una betalactamasa y que ha sido aislado de *E. Coli*. Aunque no será la secuencia definitiva para la detección eficaz de genes de resistencia, es suficiente como para realizar la prueba de concepto de nuestro ensayo de hibridación dentro del chip utilizando la tecnología microfluídica.

Aun así, paralelamente al ensayo se ha realizado una búsqueda de secuencias parciales que codifican para genes de resistencia en algunas de las bacterias causantes de cistitis. Esta búsqueda ha sido realizada utilizando la web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y buscando específicamente en la base de datos de genes.

Concretamente esta búsqueda ha sido realizada para los genes CTX-M 15 (Owens et al., 2011), (Mazzariol, Bazaj, & Cornaglia, 2017) y KPC-2 (Mazzariol et al., 2017). Ambos

codificantes de betalactamasas, las cuales actúan de inhibidores de gran parte de los antibióticos utilizados para tratar la cistitis. Cada una de estas secuencias ha sido buscada no solo para un microorganismo, sino para distintas bacterias causantes de cistitis presentes en la base de datos. Una vez obtenido un documento con una gran variedad de secuencias parciales del gen de interés copiadas en él, se procede a su alineamiento por medio del programa BioEdit v7.0.5.

Por medio de este alineamiento queremos obtener una secuencia consenso creada a partir de todas nuestras secuencias. Para ello realizamos distintos pasos como la eliminación de las secuencias que difieran por completo (principalmente transposones) o la eliminación de los extremos de cada secuencia para dejar solamente la región más conservada de cada una. La secuencia consenso obtenida estará muy conservada entre los distintos patógenos causantes de cistitis.

Finalmente, copiaremos esta secuencia en el software *GenScript* y éste nos dará las posibles sondas que se pueden diseñar a partir de ella.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. DISEÑO, FABRICACIÓN Y MONTAJE DE UN CHIP MICROFLUÍDICO**

En cuanto al diseño, fabricación y montaje de un chip microfluídico, hemos avanzado mucho respecto a los primeros chips que se idearon. Problemas como la incorrecta apertura o cierre de las válvulas se han mejorado, así como la simplificación del recorrido que deben realizar las esferas y la adecuación de las características de los canales.

Al ser una tecnología novedosa ha sido necesario familiarizarnos con ella, adquiriendo todos los conocimientos necesarios para poder montar y usar un chip. Este hecho nos ha exigido desde el comienzo adquirir las habilidades necesarias mediante la práctica reiterada con chips.

### **4.2. ENSAYOS CON ADN**

#### **4.2.1. ENSAYO DE HIBRIDACIÓN TIPO SÁNDWICH**

Por lo que respecta al ensayo de hibridación, se han analizado siete concentraciones distintas de hebra *target* junto con un blanco para cada concentración. En la siguiente tabla se recogen los valores de absorbancia de cada una de las concentraciones de hebra *target* por triplicado.

		[ADN Target]						
		ADN Target 500 nM	ADN Target 5 nM	ADN Target 0,5 nM	ADN Target 0,15 nM	ADN Target 0,05 nM	ADN Target 0,015 nM	ADN Target 0,005 nM
Absorbancia	Réplicas	1,759	1,519	0,58	0,286	0,171	0,081	0,058
		1,798	1,64	0,617	0,323	0,214	0,103	0,062
		1,859	1,609	0,592	0,292	0,179	0,083	0,061
Promedio		<b>1,805</b>	<b>1,589</b>	<b>0,596</b>	<b>0,3003</b>	<b>0,188</b>	<b>0,089</b>	<b>0,0603</b>

**Tabla 4:** En ella se recogen los valores de absorbancia de cada una de las concentraciones de hebra *target* por triplicado junto con el promedio de todos ellos. La absorbancia esta expresada en a.u. (unidades de absorbancia) y la [ADN Target] en nM.

Los promedios de estos valores se pueden representar en una curva de [ADN target] vs absorbancia para ver su evolución al modificar la concentración de la hebra *target*.



**Figura 11:** Gráfica que muestra la evolución de la absorbancia al aumentar la concentración de ADN *target*.

Además, a partir del conjunto de valores obtenidos de los blancos hemos podido calcular el límite de detección del lector ELISA, que será igual a la concentración correspondiente a la suma del promedio de los valores de absorbancia de todos los blancos más la desviación estándar de éstos multiplicada por tres.

Absorbancia / a.u.						
	Blanco 1°	Blanco 2°	Blanco 3°	Blanco 4°	Blanco 5°	Blanco 6°
Réplicas	0,053	0,063	0,053	0,047	0,045	0,06
	0,055	0,064	0,057	0,056	0,049	0,069
	0,053	0,062	0,055	0,051	0,051	0,06
Promedio	<b>0,054</b>	<b>0,063</b>	<b>0,055</b>	<b>0,051</b>	<b>0,048</b>	<b>0,063</b>

Promedio total	0,056
Desviación estándar	0,00608
Desviación estándar *3	0,01823
<b>Límite de detección</b>	<b>0,074 nM</b>

**Tablas 5 y 6:** Cálculo del límite de detección de ADN del lector ELISA a partir de los valores de absorbancia obtenidos de los blancos.

Este límite de detección corresponde a 0.074, hecho que implica que la menor concentración de ADN target que podamos detectar se encuentra entre 0,015 nM y 0,005 nM, ya que el valor del límite de detección está comprendido entre sus correspondientes valores de absorbancia.

#### 4.2.2. COMPARACIÓN DE LECTURAS ON Y OFF-CHIP

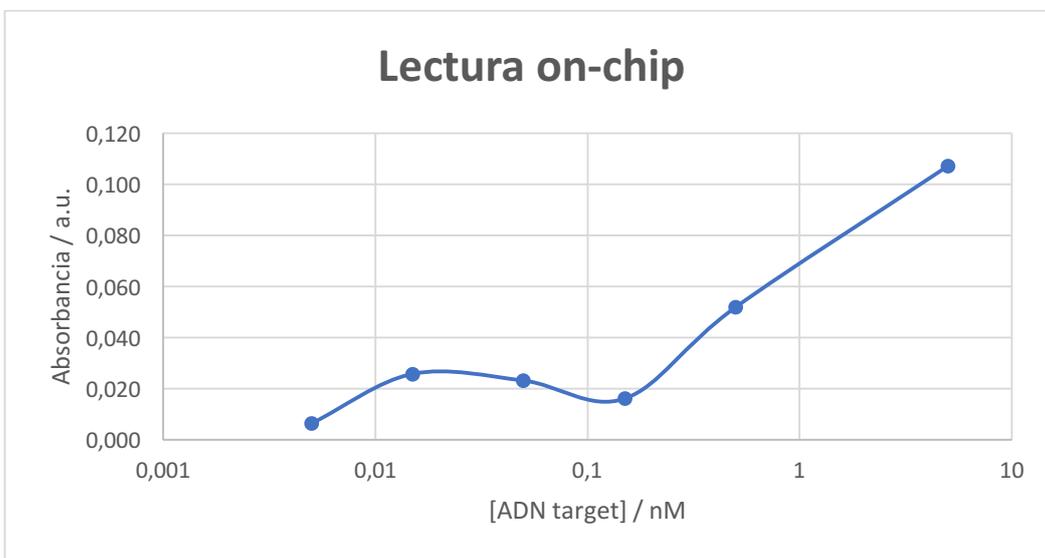
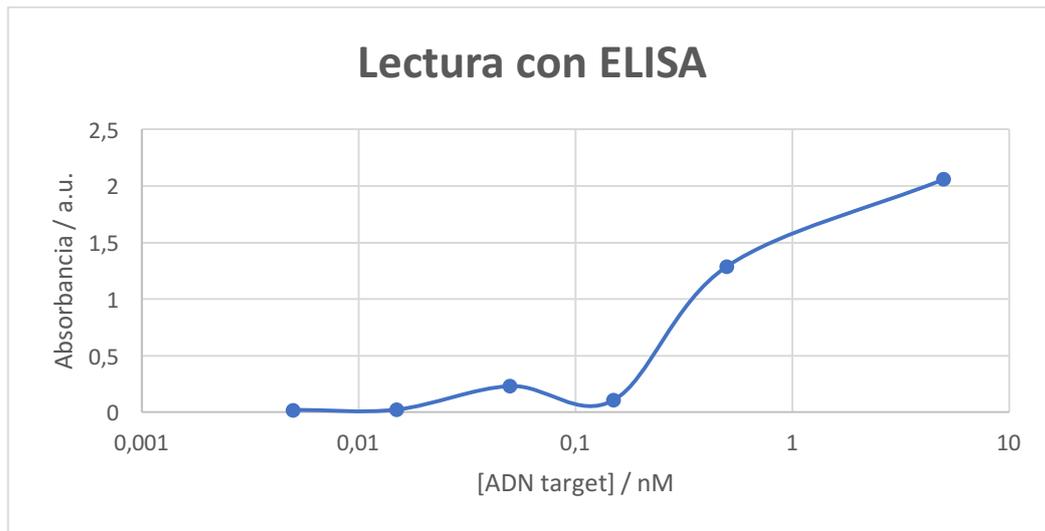
Mediante la realización de este ensayo queremos comparar los valores obtenidos tras la lectura on-chip con los obtenidos en el lector ELISA. Para ello, haremos ambas lecturas para cada concentración de hebra *target* analizada: 5, 0'5, 0'15, 0'05, 0'015 y 0'005 nM, realizando tres replicas para cada concentración en el caso del ELISA.

Dado que a partir del fotodetector utilizado en el chip obtenemos valores de voltaje del TMB sin reaccionar y del TMB reaccionado, será necesario hacer la conversión de estos dos valores a absorbancia mediante esta fórmula:

$$Abs = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \log\left(\frac{V_0}{V}\right) = \log\left(\frac{V_{TMB \text{ fresco}}}{V_{TMB \text{ oxidado}}}\right)$$

Las absorbancias obtenidas con el ELISA han sido recalculadas para poderlas comparar con las calculadas para el chip, ya que en este se toma como referencia el valor de intensidad de luz para el TMB sin reaccionar.

Los gráficos de las curvas de absorbancia/concentración se muestran a continuación:



**Figuras 12 y 13:** Gráficas que muestran la evolución de la absorbancia al aumentar la concentración de ADN *target*, tanto en el lector ELISA como en el fotodetector *on-chip*.

En vista de los resultados obtenidos en las *Figuras 12 y 13* observamos que ambas curvas comparten un patrón parecido, incluyendo la misma irregularidad. El hecho de haber obtenido un valor de absorbancia mayor en 0,05 nM que en 0,15 nM puede ser debido a variaciones en la realización del ensayo de hibridación tipo sándwich. Motivos como la manipulación distinta de cada usuario que participa en el experimento, el grado de disolución de los compuestos utilizados, la dificultad de manipular volúmenes muy pequeños, las posibles contaminaciones, etc. pueden ser la causa de esta irregularidad. Aun así, el hecho de que aparezca en ambas lecturas, no solo *on-chip*, evidencia el hecho de que se trata de un problema en la realización y no de la lectura en el interior del chip. No se pudo repetir el ensayo por falta de tiempo.

Dejando de lado este punto, observamos que obtenemos valores de absorbancia más elevados utilizando el lector ELISA que el chip. A pesar de que *a priori* podemos esperar que los dos sistemas tienen la misma sensibilidad, el hecho de haber obtenido mayor sensibilidad con el lector ELISA se puede explicar por medio del camino óptico del detector on-chip, el cual es inferior que el del lector ELISA. Aun así, el superior *surface-to-volumen-ratio* del chip tendría que compensar esta pérdida de señal, aunque no es así. Esto es debido a un tercer factor que es la distancia entre el punto en el que reacciona el TMB y el punto de lectura, que introduce un factor de dilución que produce que parte de la señal se pierda, que en el caso del chip en el que se realizó este experimento era de unos 0,71 cm. Posteriormente se reducirá esta distancia para que no influya en futuros experimentos. Es por eso que en el prototipo final del kit se espera que los valores de absorbancia sean superiores que en el lector ELISA.

Por otra parte, podemos observar que la diferencia entre el valor de absorbancia del blanco y el de la concentración mínima de ADN *target* utilizada es mayor dentro del chip que fuera.

OFF-CHIP	
[DNA <i>target</i> ]	Absorbancia
0,005 nM	0,0213
Blanco	0,0113
<b>Relación</b>	<b>1,885</b>

ON-CHIP	
[DNA <i>target</i> ]	Absorbancia
0,005 nM	0,006
Blanco	0,001
<b>Relación</b>	<b>6</b>

**Tablas 7 y 8:** Comparativa, entre el lector ELISA y el chip, de la diferencia que existe entre el valor de absorbancia del blanco y el de la [ADN *target*] mínima.

Esto es debido al hecho de que en el chip se utiliza un método de detección dinámico, permitiendo medir variaciones más pequeñas de las que se pueden detectar en el lector ELISA, en el cual las medidas se realizan con un detector distinto para cada uno de los pocillos de la placa. Al realizar una lectura en continuo nos permite eliminar el ruido de fondo y la deriva electrónica que pueda tener nuestro dispositivo, viendo así cambios más pequeños en las medidas realizadas. Es por eso que, esta mayor diferencia entre la concentración mínima detectada de ADN *target* y el blanco en el interior del chip, apunta a que el límite de detección que tendremos en el interior del chip será menor que el del lector ELISA, permitiéndonos detectar concentraciones más bajas.

Otro punto muy importante a tener en cuenta es el volumen de muestra mínimo que requiere el análisis on-chip, el cual es claramente inferior comparado con la realización

del ensayo de forma convencional. Fuera del chip nos sería imposible trabajar con volúmenes tan pequeños con los que trabajamos en el chip, tanto por la cantidad de esferas como de reactivos utilizados. Esto supone una gran ventaja económica, además de la disminución de los residuos que se generan.

#### 4.2.3. ENSAYO TIPO SÁNDWICH COMPLETO ON-CHIP

En esta primera realización de un ensayo completo tipo sándwich en el interior del chip, el movimiento de las esferas y los reactivos dentro de éste ha sido óptimo, y las distintas válvulas se han abierto y cerrado en su mayoría sin problemas.

Se ha analizado una concentración de 0,015 nM de hebra *target* para la cual hemos obtenido un voltaje de 2.65 en el caso del TMB fresco y 2.47 en el del TMB reaccionado. Obteniendo una absorbancia de 0,07. Valor de absorbancia superior al obtenido con la misma concentración, pero realizando exclusivamente la lectura en el interior del chip (0,059). Este hecho apunta a que cuantos más pasos se realicen en el interior del chip (no solo la lectura) más puntos a optimizar existen y, por lo tanto, mejores resultados se pueden obtener. Aun así, no es un hecho concluyente, ya que solo se ha podido analizar una concentración mediante un ensayo completo on-chip.

A pesar de que el ensayo se ha completado con éxito, aún se tienen que perfeccionar muchos pasos, ya sea en la fabricación y el montaje del chip o en el funcionamiento del mismo. La optimización de estos pasos podría mejorar aún más el tiempo en el que somos capaces de construir un chip y realizar un ensayo.

Como futuros experimentos se tendrían que repetir más ensayos completos on-chip utilizando distintas concentraciones de ADN *target* para compararlos con los valores obtenidos en ensayos off-chip, y también habría que probar como afecta la reducción de los tiempos de incubación en el interior del chip.

### 4.3. SONDAS PARA LOS GENES DE RESISTENCIA

En cuanto a la búsqueda de secuencias, una vez obtenidas las posibles sondas para cada uno de los genes de resistencia, debemos escoger cuál de las opciones propuestas es la más apropiada. Para ello nos fijamos en las bases puntuales que difieren entre nuestras secuencias alineadas mediante el programa *BioEdit* y descartaremos las sondas que contengan alguna de estas bases. Es por eso que procuraremos quedarnos con la sonda que contenga menos o ninguna base divergente entre las secuencias alineadas. Esta secuencia se convertirá en nuestra sonda para detectar genes de resistencia (secuencias

*target*) en patógenos causantes de cistitis. Y, además, ya podremos encargar la correspondiente secuencia *detector* complementaria a la otra mitad de bases de la secuencia *target*, para así poder obtener señal.

- En el caso del gen CTX-M 15 la sonda más apropiada para la detección del mismo en distintas bacterias causantes de cistitis sería:
  - o CGACGTTAAACACCGCCATT → Secuencia diana (*forward*)
  - o GCTGCAATTTGTGGCGGTAA → Secuencia complementaria en la que se basará la sonda.
- Y en el caso del gen KPC-2 la sonda más apropiada sería:
  - o AAGTTACCGCGCTGAGGAG → Secuencia diana (*forward*)
  - o TTCAATGGCGCGACTCCTC → Secuencia complementaria en la que se basará la sonda.

Por lo tanto, estos serían dos ejemplos de las sondas que podrían ser utilizadas en futuros microchips comercializables. Ver *Figura 14* en **ANEXO 5**.

#### **4.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

El desarrollo de la tecnología microfluídica tiene un potencial enorme para el desarrollo de dispositivos que permitan descentralizar muchos análisis, realizarlos de manera más rápida por personal no cualificado y disminuir en gran medida el coste por análisis. Varios factores sugieren que hay muchas aplicaciones en etapa temprana basadas en dispositivos microfluídicos, como la exploración de células y la optofluídica, el desarrollo de nuevos tipos de síntesis orgánica o la aparición de nuevas herramientas de diagnóstico (Whitesides, 2006), como el kit descrito en el presente trabajo.

Mediante la integración de ensayos biológicos en el interior de los chips se pretende reducir el tiempo en el que se obtienen los resultados, así como los costes de realización de los ensayos, ya sea por la cantidad de reactivos y compuestos requeridos como por el coste del dispositivo en sí.

En nuestro caso concreto, y como ya se ha apuntado, además de una significativa reducción de los costes y el tiempo de realización, también se aspira a poder detectar de manera rápida y fiable la aparición de resistencias a antibióticos, junto con la descentralización de estos tests para evitar el envío de muestras de orina a laboratorios de diagnóstico especializados, de forma que se puedan obtener los resultados *in situ* y no sea necesario disponer de instalaciones especializadas.

Además, desde una perspectiva *One health*, este kit puede llegar a ser utilizado en un futuro para la detección de genes de resistencia a antibióticos en diversos ámbitos (clínica veterinaria de animales de compañía, diagnóstico en animales de producción y diagnóstico humano) y en otros procesos patológicos (como mastitis u otitis).

## **5. CONCLUSIONES**

La cistitis es un problema que concierne tanto a animales como a humanos. Es por eso que se requiere un método de diagnóstico eficiente y de bajo coste que permita hacer frente a esta infección urinaria desde un punto de vista *One health*. Mediante la prueba de concepto del proyecto *Res-kit*, se han obtenido evidencias de que el uso de la tecnología microfluídica en la que se basa el chip desarrollado puede ofrecer más ventajas que las técnicas de diagnóstico preexistentes. En un futuro, mediante este kit no solo se realizará un diagnóstico de la infección, sino que también se facilitará la elección del antibiótico más apropiado para evitar así la generación de resistencias antimicrobianas, problema para la salud pública de gran calibre.

A partir de los ensayos realizados podemos concluir que:

- 1) El límite de detección de ADN *target* en el chip es menor que el obtenido mediante el lector ELISA.
- 2) El ensayo on-chip comparado con un ELISA convencional permite:
  - Usar pequeñas estructuras que generan el característico flujo laminar de los dispositivos microfluídicos, permitiendo acelerar las reacciones.
  - Aumentar el número de moléculas (hebras *probe*) que se podrán unir debido al alto *surface-to-volume-ratio* conseguido con las esferas.
  - Reducir los costes, ya que se requieren muchas menos esferas y reactivos.
  - Una mayor rapidez del ensayo.
  - La detección *on-site* (en la misma consulta clínica).
  - Un menor riesgo y exposición a productos químicos o biológicos.
  - Realizar múltiples ensayos en un dispositivo de un solo uso.
- 3) Aun así, hay una serie de puntos que requieren una mejor optimización:
  - Los parámetros para la apertura parcial/total y el cierre de las válvulas.
  - El método de colocación de las válvulas.
  - El sistema para ejercer presión en el chip.
  - La lectura de la señal producida por el TMB mediante el fotodetector.
  - Duración de los tiempos de incubación en el interior del chip.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Bent, S., Nallamothe, B. K., Simel, D. L., Fihn, S. D., & Saint, S. (2002). Does This Woman Have an Acute Uncomplicated Urinary Tract Infection? *Jama*, 287(20), 2701-2710. <https://doi.org/10.1001/jama.287.20.2701>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Carriço, J. A., Sabat, A. J., Friedrich, A. W., & Ramirez, M. (2013). Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution , on behalf of the ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). *Eurosurveillance*, 18(4), 1–9. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1.Research>
- Daza, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapeutica Del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57–67. Retrieved from <http://www.msc.es/fr/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
- DeMello, A. J. (2006). Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 442(7101), 394–402. <https://doi.org/10.1038/nature05062>
- Díaz-González, M., Boix, G., Fernández-Sánchez, C., & Baldi, A. (2017). Wax microfluidics light-addressable valve with multiple actuation. *Proceedings of Spie*, 10246. <https://doi.org/10.1117/12.2264919>
- Durán, L. (2018). Resistencia antimicrobiana e infecciones del tracto urinario antimicrobial resistance and implications for urinary tract infection treatment. *Revista Clínica Las Condes*, 29(2), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2018.01.002>
- Eddington, D. T., & Beebe, D. J. (2004). Flow control with hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(2), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.013>

- Errecalde, J. O. (2004). El mal uso de antimicrobianos y el desarrollo de resistencias. *Uso de antimicrobianos en animales de consumo - Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Farfán, B. M. (2015). Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 788–793. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.007>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
- Grigoryan, L., Trautner, B. W., & Gupta, K. (2014). Diagnosis and Management of Urinary Tract Infections in the Outpatient Setting. *Jama*, 312(16), 1677–1684. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.12842>
- Gupta, K., Hooton, T. M., Naber, K. G., Wullt, B., Colgan, R., Miller, L. G., ... Soper, D. E. (2011). International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 52(5), 103–120. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>
- Janasek, D., Franzke, J., & Manz, A. (2006). Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 442(7101), 374–380. <https://doi.org/10.1038/nature05059>
- Kahlmeter, G. (2003). Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens in uncomplicated cystitis in Europe. The ECO·SENS study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(2), 49–52. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00229-2)
- Kahlmeter, G., & Poulsen, H. O. (2012). Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli from community-acquired urinary tract infections in Europe: The ECO·SENS study revisited. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013>
- Little, P., Moore, M. V, Turner, S., Rumsby, K., Warner, G., Lowes, J. A., ... Mullee, M. (2010). Effectiveness of five different approaches in management of urinary tract

- infection: randomised controlled trial. *Bmj*, 340:c199. <https://doi.org/10.1136/bmj.c199>
- March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica - Elsevier*, 35(3), 182–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>
- Mayo Clinic. (2018). Cistitis. Recuperado de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseasesconditions/cystitis/symptoms-causes/syc-20371306>
- Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug resistant Gram negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, 29(sup1), 2–9. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1380395>
- Michigan Medicine: University of Michigan. (2017). Urine Culture. Recuperado de <https://www.uofmhealth.org/health-library/hw5973#hw6010>
- Monte, E. G. (2012). Infecciones de tracto urinario. *Nefrología al día*, 6(1). doi: 10.3265/Nefrologia.2010.pub1.ed80.chapter1830.
- Naber, K. G., Schito, G., Botto, H., Palou, J., & Mazzei, T. (2008). Surveillance Study in Europe and Brazil on Clinical Aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): Implications for Empiric Therapy. *European Urology*, 54(5), 1164–1178. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.05.010>
- Ogden, S., Klintberg, L., Thornell, G., Hjort, K., & Bodén, R. (2014). Review on miniaturized paraffin phase change actuators, valves, and pumps. *Microfluidics and Nanofluidics*, 17(1), 53–71. <https://doi.org/10.1007/s10404-013-1289-3>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de [http://www.who.int/topics/antimicrobial\\_resistance/es/](http://www.who.int/topics/antimicrobial_resistance/es/)
- Otto, M. (2017). Next-generation sequencing to monitor the spread of antimicrobial resistance. *Genome Medicine*, 9(1), 9–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0461-x>
- Owens, R. C., Johnson, J. R., Stogsdill, P., Yarmus, L., Lolans, K., & Quinn, J. (2011). Community transmission in the United States of a CTX-M-15-producing sequence type ST131 *Escherichia coli* strain resulting in death. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3406–3408. <https://doi.org/10.1128/JCM.00993-11>
- Pappas, P. G. (1991). Laboratory in the diagnosis and management of urinary tract infections. *Medical Clinics of North America*, 75(2), 313–325. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30456-4](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30456-4)
- Phillips, I., King, A., Rowe, B., Eykyn, S., Gransden, W. R., Frost, J. A., & Gross, R. J.

- (1988). Epidemic Multiresistant Escherichia Coli Infection in West Lambeth Health District. *The Lancet*, 331(8593), 1038–1041. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)91853-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)91853-3)
- Pigrau, C. (2013). Infecciones del tracto urinario nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(9), 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>
- Price, C. P. (2001). Point of care testing. *Bmj*, 322(7297), 1285–1288. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7297.1285>
- Price, T. K., Dune, T., Hilt, E. E., Thomas-white, K. J., Kliethermes, S., Brincat, C., ... Schreckenberger, C. (2016). The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5), 1216–1222. <https://doi.org/10.1128/JCM.00044-16>. Editor
- Stamm, W., Counts, G., Running, K., Fihn, S., Turck, M., & Holmes, K. (1982). Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *The New England Journal of Medicine*, 307(8), 463–468
- Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(sup1), S1–S4. <https://doi.org/10.1086/318850>
- Strasinger, S. K., & Di Lorenzo, M. S. (2010). *Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales* (5th ed.). Ed. Médica Panamericana.
- Tandogdu, Z., & Wagenlehner, F. M. E. (2016). Global epidemiology of urinary tract infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(1), 73–79. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000228>
- Unger, M. A., Chou, H., Thorsen, T., Scherer, A., & Quake, S. R. (2000). Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science*, 288(5463), 113–116. doi: 10.1126/science.288.5463.113
- Van Belkum, A., & Dunne, W. M. (2013). Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2018–2024. <https://doi.org/10.1128/JCM.00313-13>
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Wilson, M. L., & Gaido, L. (2004). Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 38(8), 1150–1158. <https://doi.org/10.1086/383029>

Zhanel, G. G., Hisanaga, T. L., Laing, N. M., DeCorby, M. R., Nichol, K. A., Weshnoweski, B., ... Hoban, D. J. (2006). Antibiotic resistance in Escherichia coli outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(6), 468–475.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.02.009>

## 7. ANEXO

### ANEXO 1:

Study year	ECO-SENS (E. coli) [16*]					ARESC (E. coli) [17]					Sahm et al. (E. coli) [18]						
	2007-2008					2003-2006					2000						
	Austria	Greece	Portugal	Sweden	UK	Austria	Brazil	France	Germany	Hungary	Italy	Poland	Russia	Spain	Netherlands	USA	
Ampicillin	28%	26%	34%	21%	32%	48%	56.4%	35.4%	34.9%	63.4%	53.9%	40%	43.3%	60%	27.5%	40%	
Amoxicillin-clavulanic acid	8.9%	4.3%	6.9%	2.5%	2%	1.6%	5.6%	1.4%	1.2%	9.6%	6.7%	3.3%	3.9%	4.1%	3.5%	NR	
Mecillinam	0%	1.4%	1.4%	0.5%	1%	0	4%	2.2%	1.2%	3.8%	3.3%	1.1%	1.3%	4%	3.4%	NR	
Cephalotin	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	15.6%	
Cefuroxime	NR	NR	NR	NR	NR	1.6%	3.4%	1%	0.4%	1.9%	5.4%	2.2%	3.3%	1.9%	0	NR	
Cefotaxime	2.7%	1.4%	0%	1.5%	.5%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Ciprofloxacin	4.1%	5.7%	7.6%	2.5%	0.5%	1.6%	10.7%	1.4%	3.7%	3.8%	11.7%	6.7%	12.9%	10.7%	3.4%	3.7%	
TMP/SMX	14%	18%	16%	16%	14%	29%	45.4%	12.2%	25.9%	40.3%	28.8%	20%	30.5%	33.7%	20.6%	18.6%	
Fosfomicin	0.7%	2.9%	0.7%	1%	0.5%	0	0.8%	0.2%	0.8%	0	0	0	0.3%	1.1%	0	NR	
Nitrofurantoin	0.7%	0%	1.4%	0%	0%	0	2.4%	0.9%	2.4%	0	0	4.4%	1.3%	2.1%	0	1%	
Nalidixic acid	9.6%	13.4%	16%	6.4%	7%	8%	24.5%	6.3%	9.4%	32.6%	26.3%	15.5%	17.2%	26.4%	6.8%	NR	
ESBL	1.2%															NR	NR

**Tabla 1:** Tasas de resistencia de los antibióticos usados más comunes para tratar ITUs adquiridas en la comunidad por mujeres (Tandogdu & Wagenlehner, 2016).

## ANEXO 2:

Antimicrobial testing technology	Test principle	Needs more than 10 <sup>5</sup> cells	POP or CA	Cost	Automatic or manual	Heteroresistance detection	Real MIC	Test time (h)
Currently in use								
Agar dilution testing	Growth inhibition on solid medium with antibiotics	Y	CA	L	M	+	Y	>10
Automated testing (Vitek, Phoenix, MicroScan)	Monitoring of growth or substrate conversion in a dedicated machine using optics	Y	CA	L	A	±	Y/N	<10
Broth dilution testing	Growth inhibition in liquid medium with antibiotics	Y	CA	L	M/A	±	Y	>10
Chromogenic agars	Metabolic conversion of chromogenic compounds in agar medium	Y	CA	I	M	+	N	>10
Disk diffusion	Measurement of growth inhibition around an antibiotic-containing disk	Y	CA	L	M/A	+	Y/N	>10
Etest	Measurement of growth inhibition around a strip containing an antibiotic gradient.	Y	CA	L	M/A	+	Y	>10
Fluorescent live/dead staining	Microscopy of (non)permeable cells in the presence of fluorescent stains	N	CA	L	M	-	N	<1
PCR gene detection	DNA amplification	N	CA	I	A/M	-	N	<1
Real-time microscopy	Filming bacterial division at the single-cell level	N	CA	L	M	-	N	<1

**Tabla 2:** Revisión de las tecnologías actuales para testar la susceptibilidad antimicrobiana y sus fortalezas y debilidades. Y: sí, N: no,

POP: prueba de principio, CA: disponible comercialmente, L: bajo, I: intermedio, +: detecta heteroresistencia, ±: puede detectar heteroresistencia, -: no puede detectar heteroresistencia (Van Belkum & Dunne, 2013).

**ANEXO 3:**

<b>Técnicas de diagnóstico para infecciones urinarias</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
<p><b>Bacteriuria</b></p>	<p>&gt;Rapidez</p>	<p>&gt;No todas las bacterias causantes de ITU pueden ser detectadas</p> <p>&gt;Primera muestra de orina del día</p>
<p><b>Tiras reactivas</b></p>	<p>&gt;Rapidez</p> <p>&gt;Útil tanto en leucocitos intactos como lisados</p>	<p>&gt;Falsos positivos por contaminación de la muestra</p> <p>&gt;Baja sensibilidad y especificidad</p>
<p><b>Métodos no basados en cultivo</b></p>	<p>&gt;Proporciona información de forma inmediata</p>	<p>&gt;Baja sensibilidad.</p> <p>&gt;Laborioso, poco práctico para ser rutinario</p>
<p><b>Bacteriuria</b></p>	<p>&gt;Observación directa de leucocitos</p>	<p>&gt;Los leucocitos se deterioran rápidamente</p> <p>&gt;Limitaciones en cuanto a su uso rutinario</p>
<p><b>Piuria</b></p>	<p>&gt;Determina la identidad de los agentes causantes</p> <p>&gt;Determina la susceptibilidad antimicrobiana</p>	<p>&gt; Inexistencia de una metodología estándar para poder diagnosticar con absoluta certeza una cistitis bacteriana</p> <p>&gt;Entre 24 y 72 horas para obtener resultados</p>
<p><b>Microscopia óptica</b></p>		
<p><b>Métodos Basados en cultivo</b></p>		

<b>Métodos Moleculares</b>	<b>PCR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;Rapidez</li> <li>&gt;Sensibilidad</li> <li>&gt;Robustez</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;Tamaño corto de los productos de PCR</li> <li>&gt;Conocer la secuencia de ADN diana</li> <li>&gt;Peligro de contaminación</li> </ul>
	<b>Secuenciación masiva</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;Resultados sólidos (muchas lecturas)</li> <li>&gt;Alta sensibilidad y especificidad</li> <li>&gt;<i>High-throughput</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;Previa amplificación del fragmento</li> <li>&gt;Lentitud (Rápida respecto Sagner)</li> <li>&gt;Costosa (Económica respecto Sagner)</li> </ul>
	<b>Hibridación tipo sándwich de ADN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;Económico</li> <li>&gt;Rapidez</li> <li>&gt;Determina la susceptibilidad antimicrobiana</li> <li>&gt;Minimización de residuos</li> <li>&gt;Menor exposición a productos peligrosos</li> <li>&gt;Detección <i>on-site</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt;No permite la identificación específica de la spp. bacteriana</li> </ul>
	<b>Chips microfluidicos (Res-kit)</b>		

**Tabla 3:** Resumen de las ventajas y los inconvenientes de las distintas técnicas para diagnosticar infecciones urinarias, incluyendo también a nuestro chip microfluidico (Wilson & Gaido, 2004; Price et al., 2016; Michigan Medicine Healthcare Staff, 2017; March-Rosselló, 2017; Carriço, Sabat, Friedrich, & Ramirez, 2013; Behjati & Tarpey, 2013; Otto, 2017; Farfán, 2015).

## ANEXO 4:

Protocolo detallado del ensayo de hibridación tipo sándwich:

### Día 1:

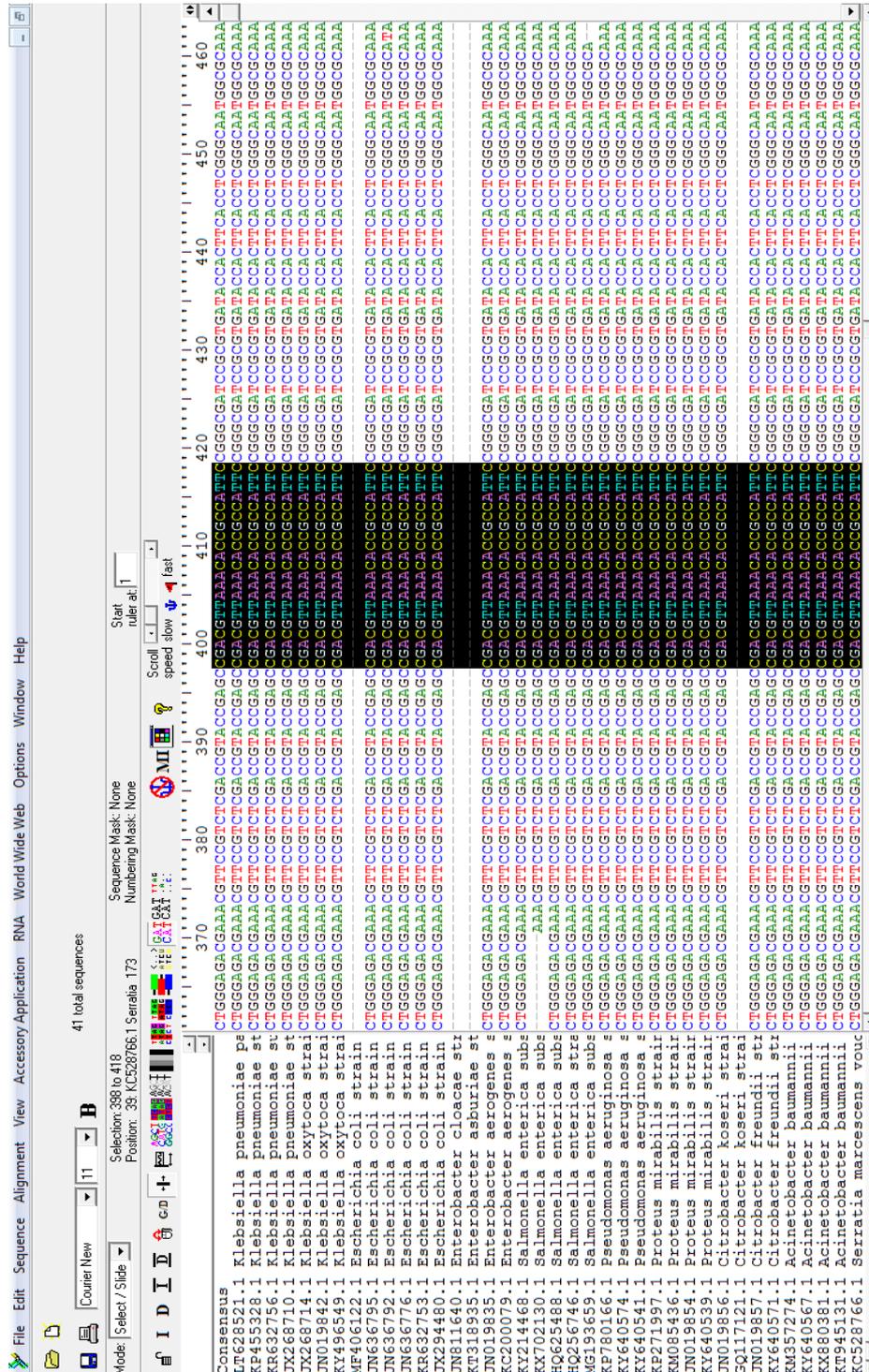
- **Limpieza/acondicionamiento de las esferas:** añadimos 125 ul de las esferas carboxiladas (2.5 %) a 375 ul de una solución de MES 50mM a pH6. Realizamos 2-3 etapas de centrifugación en MES 50mM.
- **Modificación:** Incubamos 2h en agitación a temperatura ambiente con 0.5 ml de una solución 2 mg/ml de EDC (preparado fresco) en 50mM MES pH6 y 20 ul de hebra de captura 100 uM.
- **Limpieza:** realizamos 2-3 etapas de centrifugación en MES 50mM y 1-2 etapas de centrifugación en PBS 0.05 % Tween.
- **Bloqueo:** añadimos 0.5 ml de la solución de PBST 1% BSA (albúmina de suero bovino) y dejamos incubar overnight.

### Día 2:

- **Limpieza:** realizamos 1-2 etapas de centrifugación en PBST y 1-2 etapas de centrifugación en 2XSCC a pH 7.
- **Dividir las esferas (volumen total de 500 ul) en dos eppendorfs (250 uL de esferas 0.625% a cada uno) → blanco y señal.**
- **Hibridación de la hebra *target* con la de captura (30 min):** añadimos 250 ul de solución de hebra *target* en 2XSCC a la concentración que se decida para el “eppendorf señal”, a partir de la solución madre madre 100 uM. Y en el caso del blanco añadimos 250 ul de buffer de hibridación 2XSCC sin hebra. En ambos casos el volumen final será de 500 ul.
- **Limpieza:** realizamos 2-3 etapas de centrifugación en 2XSCC.
- **Hibridación de la hebra *target* con la detectora (30 min):** añadimos en ambos eppendorfs 500 ul de la solución de hebra detectora 1 uM en 2XSCC, a partir de la solución madre 100 uM.
- **Limpieza:** realizamos 1-2 etapas de centrifugación en 2XSCC y 1-2 etapas de centrifugación en PBST.
- **Reacción estreptavidina-biotina:** Incubamos 1h en 0.5 ml de estreptavidina-HRP diluida 1:5.000 en PBST.
- **Limpieza:** realizamos 1-2 etapas de centrifugación en PBST y 1-2 etapas de centrifugación en citrato a pH 5,5. Volumen final 500 ul.

- **Reacción enzimática:** añadimos 200 ul de muestra/blanco + 100 ul de TMB sustrato. Incubamos durante 5 -15 min. Posteriormente paramos la reacción enzimática con 100 ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.
- **Lectura:** añadimos 100 ul de la mezcla de muestra + TMB + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en los pocillos de una placa ELISA y realizamos su lectura en color amarillo a 450 nm.

**ANEXO 5:**



**Figura 14:** Imagen del programa BioEdit una vez alineadas las distintas secuencias parciales del gen CTX-M-15 de las distintas bacterias. La secuencia que se encuentra en la parte superior corresponde a la secuencia consenso creada a partir de todas las demás.

