

DESARROLLO DE UN KIT TECNOLÓGICO DE MICROFLUÍDICA PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS EN INFECCIONES URINARIAS EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA



MÁSTER
UNIVERSITARIO
EN ZONOSIS
Y UNA SOLA SALUD

CURSO 2018-2019

Tutora: Laila Darwich Soliva

Directores: Antoni Baldi Coll
y Mireia Burdó Masferrer

Autora: Icíar Martínez Flórez



Desarrollo de un kit tecnológico de microfluídica para la detección de resistencias antimicrobianas en infecciones urinarias en medicina humana y veterinaria

Autor: Icíar Martínez Flórez

Tutora: Dra. Laila Darwich Soliva

Directores: Dr. Antoni Baldi Coll y Mireia Burdó Masferrer

Trabajo Fin de Máster

Máster en Zoonosis y Una Sola Salud

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, Julio 2019

Firma del autor

Icíar Martínez Flórez

Firma de la tutora

Laila Darwich Soliva

Firma de los directores

Antoni Baldi Coll

Mireia Burdó Masferrer

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a los directores del proyecto, el Dr. Antoni Baldi y el Dr. César Fernández por las enseñanzas recibidas, la paciencia y el buen trato que me han proporcionado.

Mención especial merece, mi también directora, Mireia Burdó quien estuvo conmigo en todo momento y me ayudó a superar los problemas que aparecían día a día. Siempre estuvo a mi lado paciente, aconsejándome y enseñándome.

A Meritxell Rovira que junto con Mireia, me hacía las horas de incubaciones más amenas y me enseñaba el mundo de la investigación con una sonrisa. Y, en general, a todo el equipo del IMB-CNM, que siempre me han tratado con mucho cariño.

También me gustaría agradecerle su apoyo a la Dr. Laila Darwich, por estar siempre dispuesta a ayudar en lo que fuera necesario, por los consejos y las horas invertidas en mí.

Finalmente, agradecerle a Clara Vivas su compañía en todo momento y a Carles Blasi todo el apoyo que me ha brindado incluso en momentos de estrés.

Gracias a todos.

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Infecciones del tracto urinario (ITU)	2
1.2. Resistencia antimicrobiana asociada a cistitis bacteriana	3
1.3. Técnicas de diagnóstico para las infecciones urinarias	5
1.3.1. Métodos de diagnóstico celular	5
1.3.2. Métodos de cultivo microbiológico	6
1.3.3. Métodos de diagnóstico molecular	7
1.3.4. Otros métodos de diagnóstico	7
1.4. <i>Lab-on-a-chip</i> y microfluídica: Dispositivos <i>Point-of-care</i>	7
1.4.1 Wax microfluidics	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Diseño, fabricación y montaje de un chip microfluídico	11
3.2. Instrumentación	13
3.3. Ensayos con ADN	14
3.3.1. Funcionalización de esferas	14
3.3.2. Ensayo de hibridación tipo sándwich	14
3.3.3. Ensayo tipo sándwich <i>off-chip</i>	16
3.3.4. Ensayo tipo sándwich <i>on-chip</i>	16
3.3.5 Ensayo <i>on-chip</i> con una cepa de <i>Escherichia coli</i>	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Ensayos con ADN	18
4.1.1. Ensayo tipo sándwich <i>off-chip</i> y <i>on-chip</i>	18
4.1.2. Ensayo <i>on-chip</i> con una cepa de <i>Esherichia coli</i>	23
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25
7. ANEXO	28

ABSTRACT

Las infecciones del tracto urinario (ITUs), especialmente la cistitis, son uno de los procesos infecciosos más frecuentes tanto en clínica humana como en veterinaria. Muchas de ellas son infecciones nosocomiales cuyo principal agente etiológico es *Escherichia coli*.

El tratamiento frente a las ITU se basa en antibioterapia. El diagnóstico convencional se realiza a partir de un cultivo microbiológico y un antibiograma del agente infeccioso, por lo que se trata de una metodología lenta. Debido al preocupante aumento de las resistencias antimicrobianas, que suponen un problema de salud pública, encontrar un método de diagnóstico fiable y rápido que nos permita seleccionar el antimicrobiano de elección lo antes posible, resulta tremendamente atractivo y útil para la práctica clínica.

En el presente Trabajo de Fin de Máster se pretende desarrollar un chip basado en tecnología microfluídica para la detección de cistitis de forma rápida y fiable a partir de la determinación de las secuencias específicas del ARN ribosomal 16S para *Escherichia coli*. La detección de estas secuencias se lleva a cabo mediante un ensayo de hibridación tipo sándwich sobre microesferas.

Se compararon los resultados obtenidos mediante un ensayo ELISA sobre microesferas desarrollado fuera del chip con los obtenidos mediante el chip. Estos resultados sugieren que el límite de detección usando el chip podría ser menor. El tiempo total para obtener dichos resultados también es menor en el caso del sistema *Lab-on-a-chip*.

Por lo tanto, la tecnología microfluídica en la que se basa el chip presentado en este trabajo, supondría una alternativa más rápida y eficaz a los métodos convencionales además de ser un excelente dispositivo para su implementación como *Point-of-care*.

Palabras clave: infección tracto urinario, ARN, microfluídica, resistencia antimicrobiana.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Infecciones del tracto urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se refieren a la presencia y a la multiplicación de microorganismos patógenos en el tracto urinario, acompañada o no de síntomas.

Según la naturaleza etiológica, las ITU más comunes son las que tienen un origen bacteriano (80 - 90%), en este caso, no es suficiente con detectar la presencia de las bacterias sino que hay que cuantificarlas, siendo de al menos 10^5 unidades formadoras de colonia (UFC)/ml de orina en pacientes con sintomatología clínica y de 10^3 UFC/ml en infecciones asintomáticas (De Cueto, 2005).

En cuanto a la epidemiología, las ITU suponen un importante problema de salud ya que se presentan como la segunda causa de infección más frecuente en el ser humano, sólo superadas por las infecciones respiratorias (Echevarría-Zarate et al., 2006) . Por otro lado, la mayoría de los afectados son mujeres, siendo el 50% de ellas susceptibles de sufrir al menos una infección del tracto urinario a lo largo de su vida. Esto acontece sobre todo durante el embarazo pero también depende de la actividad sexual y de la edad (Bent et al., 2002).

En medicina veterinaria, las infecciones del tracto urinario ocurren en un 14% de los perros a lo largo de su vida, siendo variable la edad a la que aparecen los primeros síntomas. También en animales, las hembras son más susceptibles de sufrir una ITU en un 26,6% frente un 6,2% de los machos (Wong et al., 2015).

Las infecciones urinarias, tanto en humanos como en clínica de pequeños animales, se clasifican clásicamente en función de las zonas anatómicas que se ven afectadas, de este modo, las ITU bajas son las que afectan a la uretra y a la vejiga, denominándose uretritis y cistitis, respectivamente. Las ITU altas afectan a los uréteres y al riñón, catalogándose como pielonefritis, siendo estas últimas de mayor gravedad clínica.

Otra forma de clasificarlas es según la complicación que atañen. Las ITU no complicadas son aquellas que se dan en pacientes que no presentan ninguna anomalía estructural ni funcional y que no hayan sido sometidos a ningún proceso de instrumentación como sería un sondaje. Suelen ser las que provocan cistitis o uretritis. En el caso de las ITU complicadas son aquellas en las que el tracto urinario del paciente no es normal, ya sea por una anomalía funcional, anatómica, así como un proceso de sondaje o cateterización o una obstrucción, por ejemplo, que predispone al paciente a sufrir infecciones recurrentes. Cabría destacar la evidente

relación entre el desarrollo de ITU y la presencia de una sonda urinaria, lo que las ha convertido en una de las infecciones nosocomiales más frecuentes. Las infecciones debidas a bacterias resistentes a antimicrobianos pertenecen a las ITU complicadas (Olin et al., 2015).

Los síntomas de las ITU son variados pero suelen ir desde una excesiva urgencia al orinar, disuria (dolor al miccionar), polaquiuria (aumento de la frecuencia al orinar), hematuria (sangre en orina), turbidez y mal olor de la orina hasta sintomatología sistémica como fiebre, dolor lumbar, náuseas, vómitos, etc. (Flores-mireles et al., 2016)

La mayoría de las ITU de origen bacteriano en humanos, son provocadas por un mismo microorganismo patógeno, *Escherichia coli*, responsable del 70-90% de las infecciones del tracto urinario descritas (Bertoni et al., 2017). El resto de las ITU bacterianas son provocadas por microorganismos como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus spp.* y *Pseudomonas aeruginosa* (Olin et al., 2015). ANEXO 1.

En el caso de la clínica de pequeños animales, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* son las bacterias gram negativas más frecuentemente aisladas en perros y gatos que padecen una ITU; mientras que *Staphylococcus spp.* y *Enterococcus spp.* son las bacterias Gram positivas más comunes (Marques et al., 2018). Sin embargo, la infección por *Proteus spp.* es más frecuente en perros y por *Enterococcus spp.* en gatos. ANEXO 2.

1.2. Resistencia antimicrobiana asociada a cistitis bacteriana

La resistencia a los antimicrobianos es la capacidad de algunos microorganismos, ya sean bacterias, virus, hongos o parásitos, de no ser susceptibles a la acción de ciertos antimicrobianos, lo que supone una persistencia de la infección que podría conllevar la muerte del paciente.

Se estima que alrededor de 25,000 personas mueren cada año en la UE como consecuencia de la resistencia a los antimicrobianos (Kahlmeter et al., 2012) y que ya supone una de las mayores amenazas para la salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud, para el año 2050, la resistencia antimicrobiana dejaría 10 millones de muertes cada año lo que supondría pérdidas de hasta 100 trillones de dólares anuales.

Las bacterias pueden ser resistentes a los antimicrobianos de manera intrínseca debido a ciertas características estructurales o funcionales que evitan que puedan ser diana de antibióticos.

Por otro lado, las bacterias pueden adquirir esa resistencia por variaciones del material genético provocadas por mutaciones cromosómicas o por transferencia horizontal de genes. Se distinguen tres mecanismos de resistencia adquirida (Blair et al., 2015):

- Disminución de la concentración intracelular del antibiótico debido a una menor penetración del mismo en la bacteria gracias a una reducción de la permeabilidad o a una expulsión activa del antibiótico.
- Modificación de la diana del antibiótico por mutación genética o modificación.
- Inactivación del antibiótico por hidrólisis o modificación.

Las infecciones del tracto urinario han de ser tratadas con antibióticos pero el mal uso que se ha hecho de ellos ha facilitado la propagación de las resistencias. Un ejemplo de uso inadecuado es utilizar los antibióticos como tratamiento ante una infección vírica, auto medicarse o usar las sobras de tratamientos anteriores. Por este motivo se hace tan importante realizar un correcto diagnóstico microbiológico y un test de sensibilidad antimicrobiana o antibiograma, a fin de conocer la susceptibilidad del microorganismo a eliminar y poder elegir un antibiótico adecuado.

Los antibióticos a los que la bacteria *E.coli* ha demostrado más resistencia son los beta-lactámicos como la ampicilina y cefalexina, y al trimetropima-sulfametoxazol, mientras que para los que la bacteria es más susceptible sería fosfomicina y nitrafurantoína (Kahlmeter et al., 2012).

El uso de las fluoroquinolonas para el tratamiento empírico de las ITU está desaconsejado por la resistencia inherente de muchos organismos Gram positivos a esta clase de antimicrobianos y el desarrollo de resistencia de los Gram negativos incluyendo cepas de *E.coli* (Olin et al., 2015)

Estos datos cobran gran relevancia ya que, cada vez es más estrecho el contacto entre propietarios y mascotas, aumentando así, el riesgo de transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos (C. Marques et al., 2018).

Por este motivo, es de vital importancia encontrar un método, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, en el que se obtengan resultados fiables en menos tiempo reduciendo el riesgo de mal uso de antibiótico y evitando la selección y propagación de estas cepas antibioresistentes.

1.3. Técnicas de diagnóstico para las infecciones urinarias

En cuanto al diagnóstico de las ITU no siempre es sencillo de realizar. En algunas ocasiones, los pacientes son asintomáticos o tienen síntomas parecidos a otras patologías con lo que el diagnóstico diferencial sería más extenso y dificultaría el proceso.

La técnica “gold standard” para el diagnóstico de una ITU bacteriana es un cultivo microbiológico urinario positivo acompañado de sintomatología de la patología. Sin embargo, en muchas ocasiones donde la vida del paciente corre riesgo, el clínico no puede esperar al resultado del cultivo y antibiograma (normalmente se requiere entre 2-3 días o más si se envían a laboratorios externos) para iniciar el tratamiento antimicrobiano.

Por tanto, es conveniente una buena anamnesis e historia clínica así como la realización de pruebas laboratoriales para un correcto diagnóstico y tratamiento. El primer paso para un urianálisis sería comprobar macroscópicamente ciertos aspectos como el color, el olor o la turbidez de la orina y después realizar distintas pruebas para acercarnos más al diagnóstico. En segundo lugar habría que realizar un examen microscópico para detectar la presencia o no de cristales urinarios, de bacterias u otros componentes como por ejemplo, eritrocitos. Este examen tiene mayor sensibilidad y especificidad si se realiza con una tinción de Gram (Anger et al., 2019).

1.3.1. Métodos de diagnóstico celular

Dentro del diagnóstico celular tiene especial relevancia el *dipstick test*, también llamado, el test de la tira reactiva de orina. Consiste en una tira de papel o plástico que contiene varias almohadillas en su superficie impregnadas en sustancias químicas que reaccionan con la orina y dan una coloración característica según los compuestos presentes en la orina (Marques et al., 2017).

Son métodos efectivos y rápidos para comprobar la presencia de bacteriuria y piuria (bacterias y neutrófilos en la orina) que apoyan el diagnóstico de infección (Herreros et al., 2018).

Las tiras también detectan el pH, presencia de proteína, glucosa, cetonas, hemoglobina, bilirrubina, urobilinógeno, nitritos, leucocitos y la densidad urinaria.

1.3.2. Métodos de cultivo microbiológico

El cultivo de orina es el método “gold standard” para confirmar la presencia de infección y por tanto, diagnosticar la patología.

Esta técnica incluye el aislamiento, crecimiento e identificación del microorganismo patógeno y al ser una técnica cuantitativa, es útil para hallar las unidades formadoras de colonia que hay en un mililitro (UFC/ml).

Como ya se ha expuesto anteriormente, muchas veces no se puede esperar al resultado del cultivo de orina para empezar con un tratamiento, es el caso de los pacientes con sintomatología grave o en los que se sospeche una ITU complicada.

En caso de que el tratamiento no funcione, sea una ITU recurrente, sea compatible con la presencia de microorganismos resistentes, el cultivo de orina está indicado y habría que esperar a los resultados del test de sensibilidad antimicrobiana para comenzar con un tratamiento adecuado.

Tradicionalmente, se establecía una presencia de al menos 10^5 UFC/ml para considerar bacteriuria, sin embargo, hoy en día se ha visto que este criterio puede excluir a pacientes que tengan síntomas aun teniendo recuentos menores de bacterias o que mostrasen piuria, por ejemplo. Por lo que, actualmente, podría considerarse como bacteriuria y susceptible de ITU, tener un recuento de entre 10^2 - 10^3 UFC/ml.

La técnica de cultivo más extendida es la siembra con asa calibrada en la que se deposita un volumen de muestra conocido en un medio de cultivo.

Normalmente, se utilizan tres medios de cultivo: medio general (Agar sangre) para el crecimiento de Gram positivos y negativos, medio selectivo (Agar McConkey) para el crecimiento de *enterobacterias* y algunos bacilos Gram negativos, y el medio Agar Saboureaud, para la detección de hongos y levaduras. Aunque últimamente, se ha popularizado el uso de agar CLED (cistina-lactosa deficiente en electrolitos) que permite el crecimiento de gram negativos, gram positivos y levaduras (De Cueto, 2005).

Por otro lado, existen los medios cromogénicos en los que se identifica directamente qué patógeno es a partir de los sustratos que colorean las colonias dependiendo del microorganismo.

A su vez, existe una técnica de cultivo semicuantitativo, denominada *Dip-slide* que se trata de un tubo recubierto de medio de cultivo que se introduce en la orina y después se analiza en el laboratorio (Walshaw et al., 2007)

1.3.3. Métodos de diagnóstico molecular

Aunque en la práctica, muchas de las infecciones urinarias no sean diagnosticadas por estos métodos, el diagnóstico molecular se ha convertido en un imprescindible de la medicina moderna debido a su alta sensibilidad y especificidad y acorta considerablemente los tiempos de obtención de los resultados.

Con las técnicas moleculares se detecta y amplifica el material genético de la muestra sin que sea necesario el aislamiento del patógeno (Farfán, 2015). Entre estas técnicas destacan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR de transcripción inversa (RT-PCR), la real-time PCR que es cuantitativa (qPCR) así como la hibridación *in situ* (HIS).

Cada vez más se requieren técnicas que permitan obtener resultados fiables en poco tiempo. Los métodos moleculares usados hasta ahora, aunque son más rápidos que los cultivos en placa, requieren una etapa de amplificación del material genético.

1.3.4. Otros métodos de diagnóstico

Otro de los métodos es la identificación bacteriana basada en la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF MS, por sus siglas en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*. Consiste en identificar al microorganismo según el perfil de proteínas característicos para cada microorganismo (Ferreira et al., 2010).

1.4. *Lab-on-a-chip* y microfluídica: Dispositivos *Point-of-care*

Los dispositivos *Lab-on-a-chip* (LOC) son aquellos que integran dentro de un chip, una o varias pruebas normalmente realizadas en un laboratorio. Son biosensores que incorporan

marcadores (de tipo enzimático, fluorescentes...) que permiten la detección de parámetros biológicos (bacterias, mutaciones de ADN, alteraciones enzimáticas, etc.) (Zarei, 2017).

Los dispositivos LOC están basados en sistemas microfluídicos cuya principal ventaja es que permiten trabajar con volúmenes mucho menores a los usados habitualmente por lo que se reducen los costes y el tiempo de obtención de resultados, además de aumentar la sensibilidad de la prueba (Burmeister et al., 2019). Otra de las grandes ventajas de estos dispositivos es que la mayoría son *user-friendly*, es decir, que pueden ser utilizados por personal no entrenado. Estas ventajas facilitan obtener un diagnóstico a tiempo e integrarlos en el concepto de *Point-of-care* (POC).

El concepto POC surge ante la necesidad de un diagnóstico rápido que pueda ser de ayuda para tratar una patología y que además sea posible realizarlo *on-site*, es decir, fuera del laboratorio. Son sistemas que integran todos los pasos y funciones necesarias, por ejemplo, en el caso del diagnóstico molecular, los sistemas POC han de poder realizar los procesos de extracción y purificación de ácidos nucleicos directamente de la muestra (Farfán, 2015).

Para realizar ensayos de hibridación se necesita de un soporte donde llevar a cabo el ensayo. Uno de los soportes utilizados en tecnología microfluídica son las microesferas. La funcionalización de los dispositivos LOC es una tarea compleja, de modo que disponer de un soporte funcionalizable externamente es realmente una gran ventaja (Lim et al., 2015).

1.4.1 *Wax microfluidics*

En los sistemas microfluídicos son necesarios ciertos elementos, como las válvulas, para poder controlar el flujo de los líquidos que se encuentran en su interior. El grado de integración de estos elementos actuadores en los sistemas LOC define la portabilidad de dichos dispositivos.

Uno de los tipos de válvulas más reportadas son las neumáticas. Estas válvulas están fabricadas con un polímero denominado PDMS (polidimetilsiloxano). Constan de dos capas que se actúan mediante una fuente de presión externa no integrada en el sistema, de modo que la capa superior presiona la otra, regulando el flujo (Au et al., 2011).

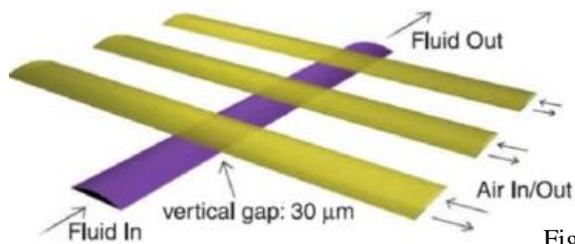


Figura 1: Esquema de una válvula neumática (Au et al., 2011)

Por otro lado, se encuentran las válvulas tipo barrera, fabricadas con materiales tipo ceras (parafina) que son fácilmente integradas en los canales microfluídicos y se actúan fundiendo y desplazando la barrera. En general se controlan ópticamente (por pulsos de luz, láser...). La principal limitación de este tipo de válvulas es que son de un solo uso (Chen et al, 2008).

(Díaz-González et al., 2017) han desarrollado una tecnología basada en válvulas de cera que pueden integrarse totalmente en un dispositivo LOC (Figura 2) y pueden abrirse y cerrarse múltiples veces mediante pulsos de luz. La fuente de luz es una matriz de LEDs que forman parte de la instrumentación del sistema y se sitúan debajo del chip, alineados con las válvulas integradas en el chip.

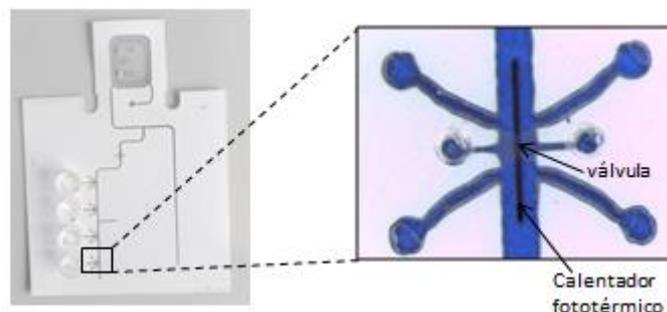


Figura 2: Ejemplo del esquema del chip microfluídico y la estructura de una de las válvulas.

El principio de funcionamiento de la tecnología se basa en calentar localmente la barrera de cera para abrir o cerrar un túnel en ella que regule el paso del líquido. Esto se consigue mediante un elemento denominado calentador fototérmico, que transforma la energía lumínica en energía calorífica, de modo que se funde solo la cera que está en contacto directo con el calentador. El calentador fototérmico consiste en una línea de tóner negro que atraviesa completamente la barrera de cera. El procedimiento de apertura de las válvulas, además, requiere aplicar presión para desplazar la cera fundida y que se forme el túnel. Para cerrarlas, no se aplica presión, de modo que la cera fundida no se desplaza, sino que rellena el túnel, cerrándolo. La presión se aplica con un actuador lineal tipo émbolo que presiona una cámara de bombeo integrada en el chip.

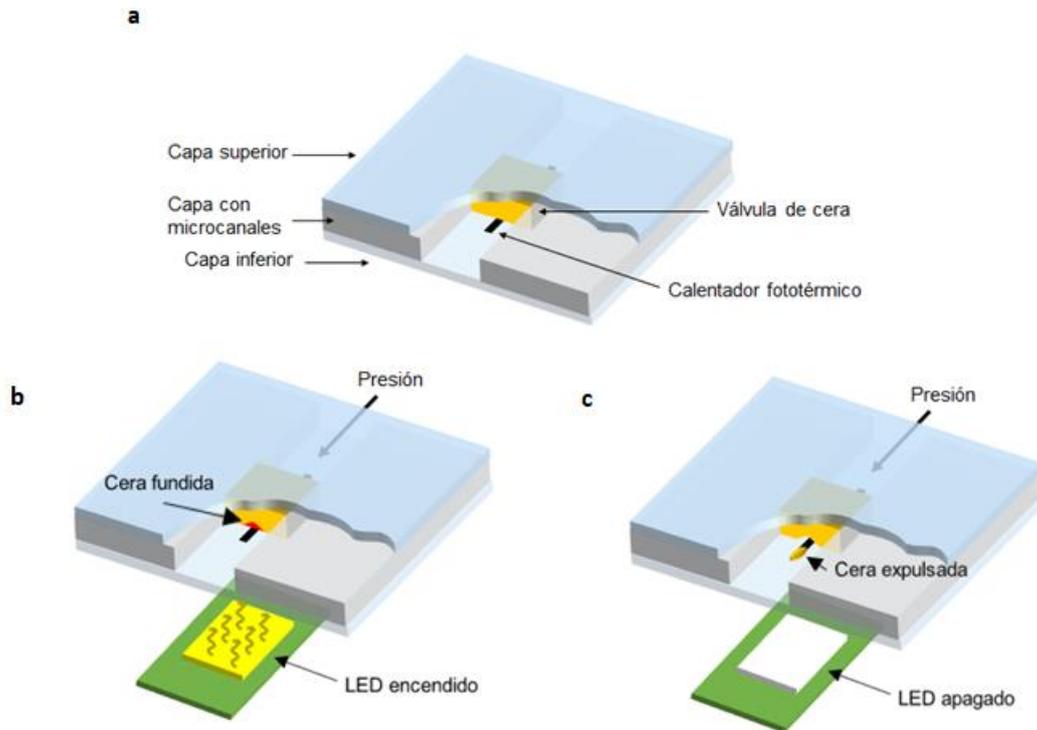


Figura 3: Representación esquemática de las capas del dispositivo (a) y del mecanismo de apertura de la válvula de cera (b, c). Para abrir la válvula, el LED se activa mientras se aplica una diferencia de presión a través de la barrera (b). La cera en contacto con la línea del calentador térmico se derrite y es expulsada de la barrera formando un pequeño túnel (c).

2. OBJETIVOS

Este proyecto realizado por el Centro Nacional de Microelectrónica (IMB-CNM, CSIC) en coordinación con la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona y el Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA-IRTA), surge de la necesidad de crear test de diagnóstico rápido para poder prescribir tratamientos antimicrobianos adecuados y reducir el aumento de las resistencias antimicrobianas que tanto preocupa a nivel de Una Sola Salud (*One Health*).

El proyecto consiste en la fabricación de un sistema *Lab-on-a chip* que se pueda implementar para su uso como *Point-of-care*, basado en la detección de una secuencia concreta de ARN ribosomal para poder cuantificar la presencia de bacterias en una muestra y conocer su resistencia antimicrobiana.

En un futuro se pretende que el chip esté automatizado y pueda comercializarse de tal forma que un clínico pueda realizar esta prueba en su consulta sin necesidad de enviar la muestra a un laboratorio. La muestra será tomada directamente del paciente, ya sean animales o

humanos, y valdrá con una gota de su orina para diagnosticar la cistitis y observar su susceptibilidad a los diferentes antibióticos.

El objetivo principal de este trabajo de fin de máster es realizar una prueba de concepto de la tecnología microfluídica para la detección de cistitis bacterianas en muestras de orina. Los objetivos específicos son:

- 1- Estandarizar un protocolo de ensayo de ADN sobre microesferas para la cuantificación de la secuencia 16s del ARN ribosomal de *E.coli*.
- 2- Adaptar este protocolo de ADN sobre microesferas dentro de un prototipo de sistema microfluídico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño, fabricación y montaje de un chip microfluídico

Una de las formas más simples y baratas de fabricar dispositivos microfluídicos es usando sustratos de plástico con técnicas de prototipaje rápido. Por eso, para la fabricación de los chips microfluídicos, se han utilizado un software de diseño tipo Corel Draw y una grabadora Laser Epilog Mini 24 de *Epilog Laser* para cortar las distintas capas que confieren el dispositivo. La cera microcristalina para formar las válvulas se ha comprado a Iberceras Specialities S.L.U.

El chip microfluídico consta de tres capas de diferentes materiales. La capa inferior es de poliéster transparente y en ella se imprimen las líneas de tinta negra que servirán de calentadores fototérmicos. La capa superior también es de poliéster transparente y en ella se encuentran los *inlets* y *oulets* del sistema por los que introduciremos la cera para formar las válvulas, así como, las microesferas y los distintos reactivos en los canales a través de los reservorios.

Las dos capas se pegan mediante una tercera capa, de PSA (pressure-sensitive adhesives) que tiene adhesivo por los dos lados. Es en esta capa en la que se definen los elementos microfluídicos (canales, válvulas, *inlets*, *outlets*...).

El resto de los elementos que componen el chip son:

- Los reservorios, que son piezas de un polímero termoplástico denominado polimetilmetacrilato (PMMA) sirven para almacenar los reactivos en el chip.
- Unas estructuras realizadas con un polímero elastómero llamado polidimetilsiloxano (PDMS) que forman parte de la cámara de bombeo para que sea posible el control del flujo de los reactivos dentro del chip.

Para montar el dispositivo, en primer lugar, es necesario lavar las capas de poliéster transparente con isopropanol para eliminar los residuos provenientes del corte. Seguidamente, se vacían los canales de la capa de PSA y se pegan bien las dos transparencias de forma que queden bien colocadas entre ellas. Es imprescindible que se alineen perfectamente los calentadores fototérmicos (líneas negras) de la base con los espacios reservados para las válvulas presentes en la capa de PSA. Antes de unir las, introduciremos las piezas de PDMS en el espacio que actuará como cámara de bombeo y haremos un corte a modo de filtro en la zona destinada a ser el área de retención de las esferas.

Las estructuras de las válvulas se han diseñado de modo que, mediante fuerzas de capilaridad de la cera fundida en su interior, se facilite su fabricación. El chip microfluídico se sitúa encima de una placa calefactora calentada a 90°C. Se coloca la cera sobre unos agujeros que hay en la capa superior y esta se funde de modo que entra al canal por capilaridad, dando lugar a la válvula.

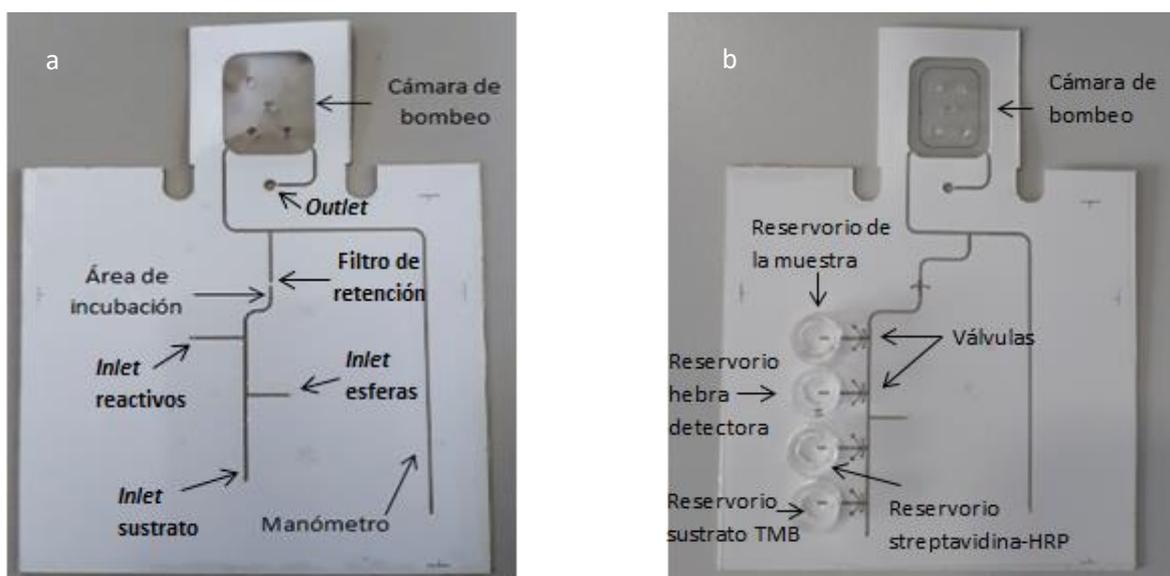


Figura 4: Señalización de las distintas partes del microchip. La primera de ellas (a) corresponde al chip sin válvulas, sólo con *inlets* y la segunda (b) al chip con reservorios y válvulas.

3.2. Instrumentación

La instrumentación necesaria para utilizar el chip es la siguiente:

- Una matriz de 64 LEDs blancos: fuente de luz que se utiliza para abrir las válvulas. Cada uno de los LEDs permite abrir una válvula distinta. Los calentadores fototérmicos situados encima de los LEDs transforman la energía lumínica en energía calorífica de modo que las válvulas de cera se funden formando un túnel que permite el paso de los líquidos.
- Un actuador lineal: motor que permite manejar los flujos dentro del chip. Se basa en un motor paso a paso, de modo que cuando rota comprime o expande la cámara de bombeo ejerciendo presión dentro del chip.
- Un fotodetector y un LED de color rojo: utilizados para la medida de absorbancia. La medida se obtiene en valores de voltaje que serán convertidos en valores de absorbancia mediante una fórmula.
- El actuador lineal y la matriz de LEDs están controlados con un instrumento basado en Arduino y un software creado a través de la interfaz Labview. Este programa permite controlar la presión y la apertura o cierre de las válvulas.

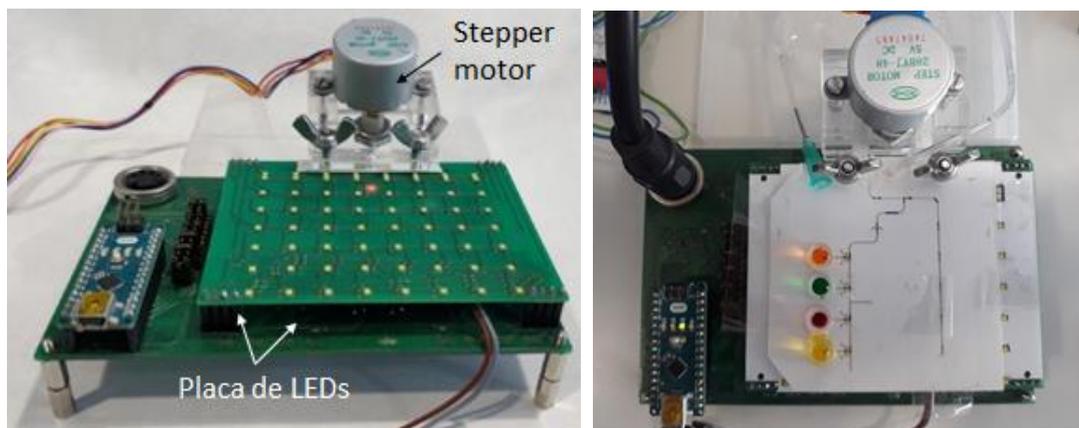


Figura 5: Instrumentación utilizada. a) Matriz de LEDs y stepper motor para controlar el flujo. b) Chip microfluídico sobre el dispositivo.

3.3. Ensayos con ADN

3.3.1. Funcionalización de esferas

Para realizar el ensayo de hibridación se utilizarán microesferas carboxiladas de poliestireno de 20 μ m y 30 μ m (Polysciences, Inc.; Epruibiotech Co. Ltd.) como soporte de inmovilización de la hebra de captura. Al tener grupos carboxilos (COOH) en su superficie, el grupo amino (NH₂) de la hebra de captura se unirá a ellos mediante un *cross-linker*, estableciéndose un enlace covalente.

3.3.2. Ensayo de hibridación tipo sándwich

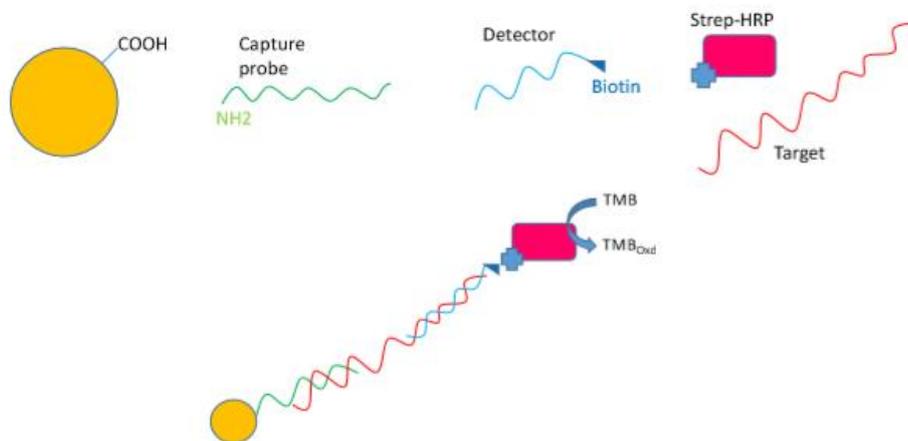


Figura 6: Esquema de los elementos utilizados para realizar el ensayo de hibridación tipo sándwich con ADN.

Para realizar la detección y cuantificación de la bacteria, se ha escogido la secuencia 16s del ARN ribosomal. Es una molécula muy abundante en bacterias (6700–71000 copias/célula aprox.) (Esfandiari et al., 2016) por lo que no sería necesaria la amplificación de ácido nucleico. Además, cuenta con secuencias comunes para todas las especies y secuencias únicas para cada especie, lo que le convierte en una diana ideal para la identificación de patógenos de forma rápida y fiable. (Koo et al., 2018).

Para su detección se necesitan dos hebras de ADN complementarias, la hebra de captura y la hebra detectora. Los oligonucleótidos de la hebra de captura se dirigen hacia las regiones accesibles de la secuencia que queremos detectar, como serían las horquillas.

Gracias a la gran diversidad de secuencias existentes entre especies, la hélice 18 es una región útil a la hora de escoger sondas para diferenciar especies bacterianas (Ward et al., 1990).

Para el ensayo de hibridación tipo sándwich se han escogido 3 hebras de ADN (Mastali et al., 2008):

- **Target (30 pb)** → 5'- TCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATA -3'
- **Captura (15 pb)** → (NH₂) 5'- TATTAACCTTACTCC-3'
- **Detectora (15 pb)** → 5'- CTCCTCCCCGCTGA-3'(biotina)

La base del ensayo se centra en la detección de la hebra *target* mediante la hibridación con las hebras de captura y detectora. La hebra *target*, consta de 30 pares de bases, de las cuales 15 son complementarias con la hebra de captura, lo que permitirá la hibridación de esta hebra a las esferas. Por otro lado, la hebra detectora también es complementaria en 15 pares de bases a la hebra *target*. Además, la hebra detectora está biotinilada para poder reaccionar con el conjugado estreptavidina-HRP produciendo un enlace de alta afinidad. La detección del complejo se realiza mediante reacción enzimática con el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina), produciéndose un cambio de color correspondiente a la oxidación de éste al reaccionar con la enzima HRP.

Durante los ensayos, es necesaria, la limpieza con diferentes buffers para asegurar que la señal de TMB oxidado se debe a la HRP unida a las hebras de captura adheridas a las esferas.

Los reactivos que se utilizaran en el ensayo son los siguientes:

- MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) → acondiciona las esferas favoreciendo el enlace entre los grupos carboxilos de las esferas y los grupos amino de la hebra de captura.
- EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) → *cross-linker* que activa los grupos carboxilo para favorecer la reacción con las aminas, habilitando la inmovilización de los péptidos.
- PBST (phosphate buffered saline con Tween 0.05%) → buffer de limpieza.
- PBST-BSA 1% (phosphate buffered saline con Tween y bovine serum albumin 1%) → agente bloqueador para evitar uniones inespecíficas, tanto en las esferas como en el chip.
- 2xSCC (saline-sodium citrate) → buffer para favorecer la hibridación.
- Citrato → buffer de acondicionamiento del medio para favorecer la reacción enzimática.

3.3.3. Ensayo tipo sándwich *off-chip*

El proceso se lleva a cabo en tubos *ependorf*, por ello, todas las etapas intermedias de limpieza se realizarán mediante centrifugación. Este ensayo se realiza durante dos días (ANEXO 3), en el primero de ellos se lleva a cabo la modificación de las esferas carboxiladas con la hebra de captura. Para ello, hay que limpiar y acondicionar las esferas con MES. A continuación, se incuban a temperatura ambiente en agitación durante dos horas, las esferas con EDC y la hebra de captura. Tras la incubación, se centrifugan las esferas en PBST 0,05% y se dejan bloqueando durante toda la noche en PBST-BSA 1% a 4°C.

Al día siguiente, se realizan limpiezas en PBST 0,05% y en 2xSCC y se divide el volumen de las esferas (500uL) en dos *ependorfs* previamente bloqueados con PBST-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Solo se añade la hebra *target* a una concentración conocida en uno de los *ependorfs*. El otro será el blanco para validar la prueba. La incubación con la hebra *target* se realiza durante 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Se realiza el ensayo con distintas concentraciones de hebra *target* a fin de obtener el límite de detección de la técnica. Tras limpiar en 2xSCC, se procede a la incubación con la hebra detectora (30 minutos a temperatura ambiente y en agitación).

Después de los lavados en 2xSCC y PBST 0,05%, se incuba 1 hora (en agitación y a temperatura ambiente) con el conjugado estreptavidina-HRP que unirá la estreptavidina con la hebra detectora biotinilada.

Se procede a la centrifugación de la muestra en PBST 0,05% y en citrato y se añade el sustrato (TMB). Pasados 15 minutos, se para la reacción enzimática con H₂SO₄ y se introduce la solución, por triplicado, en una placa de 96 pocillos para realizar la lectura mediante un lector ELISA a 450nm.

3.3.4. Ensayo tipo sándwich *on-chip*

Para realizar el ensayo de hibridación dentro del chip es necesario funcionalizar las esferas externamente del mismo modo. Es decir, se ha de formar el enlace covalente entre los grupos carboxilo de las esferas y el grupo amino de la hebra de captura y posteriormente, bloquear con PBST-BSA 1%.

Para los ensayos *on-chip* se han utilizado colorantes para visualizar el movimiento de los líquidos dentro del dispositivo. Se han utilizado dos diseños distintos para realizar los ensayos *on-chip*: un diseño simplificado sin válvulas (figura 4a) y otro automatizado con válvulas (figura 4b).

En los dos casos se cebará el dispositivo con agua. Para ello, se introduce el chip en una cámara de vacío para sacar el aire y llenarlo de agua. Es importante asegurarse de que no quedan burbujas dentro de los canales.

Para el chip simplificado, se usará cinta adhesiva para abrir y cerrar las entradas de líquido dentro del dispositivo. Una vez lleno de agua, se colocará el chip sobre la placa de LEDs y se situará la cámara de bombeo bajo el actuador lineal. Para tener un control de la presión dentro del sistema durante todo el ensayo, se integrará un manómetro en el chip. Este consiste en un canal parcialmente lleno de aire que se contrae o se expande en función de la presión.

El siguiente paso consiste en bloquear el área de detección con PBST-BSA 1% durante 15 minutos a fin de evitar adsorciones inespecíficas. Seguidamente se introducen las esferas funcionalizadas a través del *inlet* correspondiente y se acumulan en el área de incubación al ejercer presión con la ayuda del motor. Se realiza un lavado con PBST 0,05% y se tapa el *inlet* con cinta adhesiva.

Se abre el *inlet* por donde se introducen la muestra y los reactivos y se procederá a las incubaciones con las hebras *target* y detectora. Las dos incubaciones se realizarán de forma dinámica durante 20 minutos a temperatura ambiente. Por último, se incubará durante 40 minutos a temperatura ambiente de forma dinámica la estreptavidina-HRP. Tras ellas, se hará un lavado con PBST 0,05%.

Se cierra el *inlet* de los reactivos con cinta adhesiva y se abre el *inlet* del sustrato. Primero se introducirá PBST 0,05% a modo de limpieza y tras ello, se introducirá el TMB. En este paso se colocará el fotodetector encima del punto de lectura y se procederá a la incubación estática y a temperatura ambiente con el sustrato durante 2 minutos. La detección se realiza de forma dinámica, comparando TMB fresco (que no ha reaccionado con la enzima) y TMB oxidado (que ha reaccionado con la enzima) obteniendo un valor de voltaje para cada medida, que se correlacionará con la absorbancia de la solución.

El protocolo para realizar el ensayo *on-chip* con válvulas es el mismo, sin embargo, prescindimos de la cinta adhesiva para cerrar los *inlets* de los canales y hacemos uso de las válvulas. Cuando tengamos que introducir las esferas, cualquier reactivo o el sustrato enzimático (TMB), debemos abrir la válvula correspondiente ejerciendo presión con el *stepper motor*. Cuando no necesitemos utilizar ese canal, cerraremos la válvula.

3.3.5 Ensayo *on-chip* con una cepa de *Escherichia coli*

En este ensayo, se ha utilizado una cepa de *Escherichia coli* procedente del cepario del Laboratori Veterinari de Diagnosi de Malalties Infeccioses (LVDMI) de la Facultad de Veterinaria de la UAB. Una vez descongelada y cultivada en medios adecuados (A. McConkey), se procede a hacer una suspensión bacteriana de concentración 4 de McFarland (equivalente a $1,2 \times 10^9$ UFC/ml) y otra de concentración 1 de McFarland (que equivale a 3×10^8 UFC/ml). A partir de esta concentración se realiza la extracción de RNA total de la muestra mediante un kit comercial (NucleoSpin® de ARN, Macherey-Nagel). Las copias de RNA fueron cuantificadas mediante un aparato de espectrofotometría.

El ensayo se lleva a cabo de la misma forma que se ha descrito en el apartado anterior, sustituyendo la hebra *target* por el sobrenadante extraído, con cualquier de los dos métodos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos con ADN

4.1.1. Ensayo tipo sándwich *off-chip* y *on-chip*

Inicialmente los ensayos *off-chip* fueron realizados con esferas carboxiladas de 20µm de diámetro. Se escogió este tamaño ya que eran las únicas esferas comerciales con el grupo funcional -COOH. Sin embargo, al adaptar el ensayo *on-chip*, se vio que el comportamiento microfluídico se veía comprometido al usar esferas de 20µm debido a que bloqueaban el flujo dentro del chip. Este fue el motivo principal por el cual, posteriormente, se decidió usar unas nuevas esferas carboxiladas de 30µm que aparecieron en el mercado.

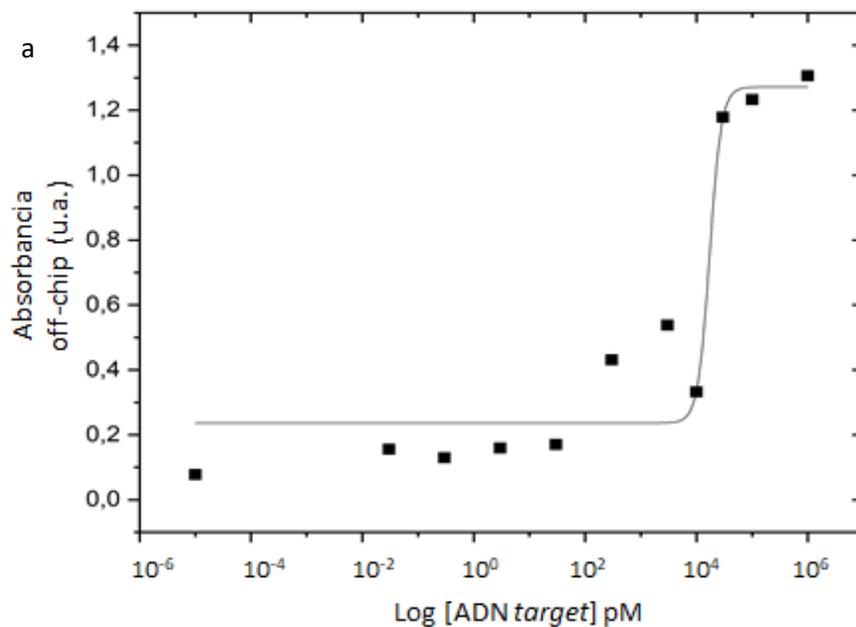
La relación superficie-volumen de ambas esferas es muy parecida, lo que nos indica que los resultados serían prácticamente los mismos de haber realizado el ensayo *off-chip* con las esferas de 30µm y, por tanto, podemos compararlos de igual forma.

Para realizar el ensayo de hibridación de ADN fuera y dentro del chip, hemos utilizado distintas concentraciones de hebra target cuyos valores de absorbancia quedan reflejados en la siguiente tabla:

[ADN target]	<i>ON-CHIP</i>	<i>OFF-CHIP</i>
	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)
1μM	Saturado	1,306
100nM	-	1,233
30nM	-	1,178
10nM	1,1357	0,332
3000pM	0,6445	0,538
300pM	0,04226	0,431
30pM	0,01721	0,1705
3pM	0,01922	0,1595
300fM	0,01029	0,129
30fM	0,00669	0,1555
Blanco	0,00525	0,078

Tabla 1 En ella se recogen los valores de absorbancia de cada una de las concentraciones de hebra target en los ensayos *on-chip* y *off-chip*.

Estos valores se pueden representar en una gráfica para ambos casos en la que se describe la relación entre la concentración de hebra target de ADN y su absorbancia (figura 5).



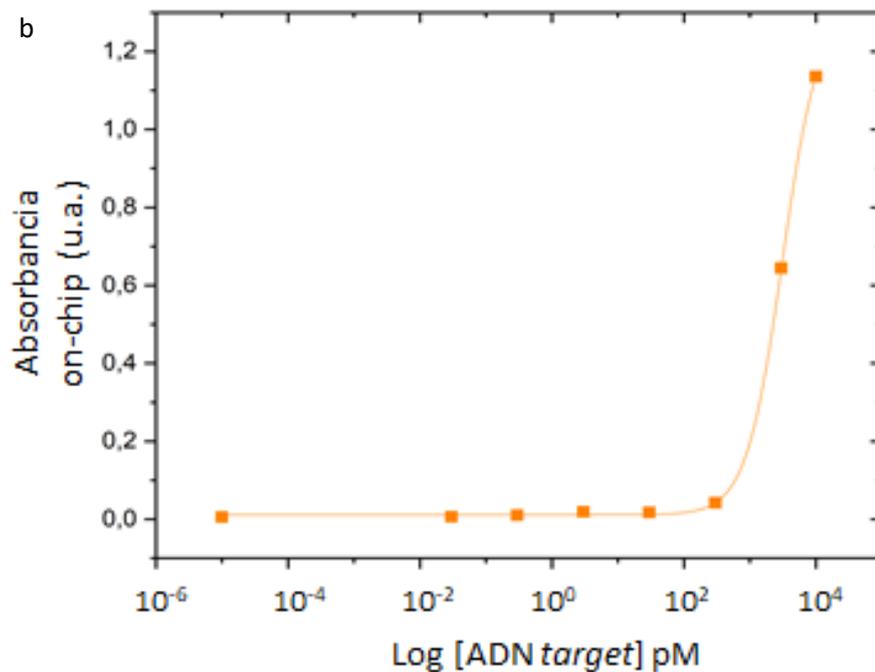


Figura 7: Gráficas que muestran la evolución de la absorbancia al aumentar la concentración de ADN target fuera del chip (a) y dentro del chip (b).

En las dos gráficas, el resultado es una curva de típicamente sigmoidea que representa los valores de absorbancia expresados en unidades de absorbancia (u.a.) resultantes de la lectura de las diferentes concentraciones de hebra target de ADN.

Si realizamos una gráfica de los valores más pequeños de absorbancia, podríamos comparar las diferencias existentes entre el ensayo *on-chip* y el *off-chip* (figura 6).

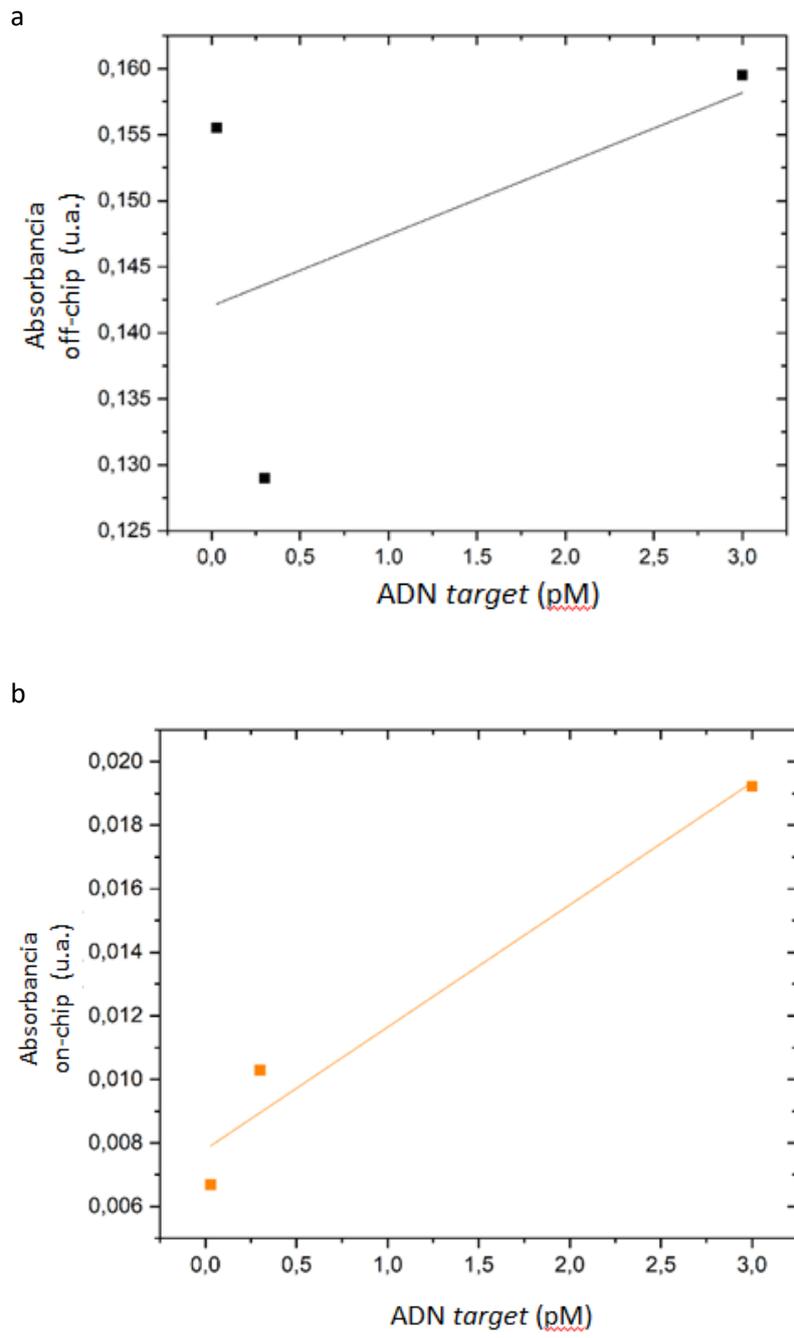


Figura 8: Gráficas que muestran la evolución de la absorbancia al aumentar la concentración de ADN target fuera del chip (a) y dentro del chip (b) en los últimos 3 puntos.

En estas gráficas se puede apreciar una mayor correlación lineal en el caso de la curva *on-chip*, es decir, que dentro del chip se pueden ver diferencias más significativas y detectar pequeños cambios que no podemos ver utilizando un lector ELISA.

Los valores obtenidos de la detección *on-chip* son medidos en voltaje y requieren ser convertidos a valores de absorbancia para poder compararlos con los *off-chip*. Para determinar la señal analítica se miden dos valores de voltaje distintos, el correspondiente al TMB oxidado y al TMB que no ha reaccionado con el enzima, llamado TMB fresco. La fórmula que relaciona el voltaje y la absorbancia es la siguiente:

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

Cabe destacar el papel del camino óptico a la hora de analizar la sensibilidad de ambas pruebas. El camino óptico es la distancia que recorre la luz en el punto de medida, en este caso, desde el LED hasta el fotodetector. La absorbancia responde a esta fórmula:

$$Abs = \varepsilon cd$$

En la que ε es una constante, c es la concentración y d es el camino óptico. Este último, en la placa ELISA es mayor (1mm) que en el chip (100 μm) lo que supone una desventaja del sistema microfluídico ya que se obtendrán valores de absorbancia menores. Sin embargo, en el chip los valores se detectan de una forma dinámica en la misma “celda”, de modo que el tiempo entre la medida de TMB fresco y la de TMB oxidado es suficientemente corto para que no se vea afectada por las interferencias ocasionadas por cualquier deriva que ocurra en el sistema. De esta manera se consiguen medir cambios en la absorbancia mucho menores, y, por lo tanto, se consiguen límites de detección similares con un camino óptico mucho menor. Además, esto se ve compensado por la mayor relación superficie-volumen existente usando las microesferas dentro del chip, lo que permite acortar los tiempos de incubación.

Por lo que respecta al comportamiento microfluídico, evaluable gracias al manómetro y al uso de colorantes, fue correcto en todos los ensayos realizados una vez se cambiaron las esferas de 20 μm por las de 30 μm . La cantidad de esferas utilizadas en cada ensayo era constante, asegurando que acumulábamos 1mm de estas en la zona de retención.

En algunos ensayos observamos fugas en las válvulas que imposibilitaban la realización del ensayo de forma correcta, por ello, decidimos prescindir de la utilización de las válvulas en el chip para validar la prueba de concepto. El uso de válvulas permite automatizar el ensayo pero no debería haber diferencias en cuanto a los resultados analíticos derivados de la

hibridación. Por eso, ambos diseños son perfectamente comparables, demostrándose que el ensayo se puede realizar *on-chip* de todos modos.

Aunque los ensayos no han sido optimizados ni se han hecho réplicas, los resultados preliminares que se han obtenido son prometedores.

4.1.2 Ensayo *on-chip* con una cepa de *Escherichia coli*

El ensayo con muestras de *E.coli* se realizó *on-chip* de la misma forma que se había hecho anteriormente. Se testaron dos concentraciones diferentes, 3×10^8 UFC/ml y $1,2 \times 10^9$ UFC/ml. La extracción de ARN dio lugar a $12,83 \mu\text{g/ml}$ y $18,07 \mu\text{g/ml}$, respectivamente, determinados por espectrofotometría.

En ninguno de los ensayos obtuvimos señal correspondiente a la detección de la bacteria (figura 7). La señal obtenida corresponde a adsorciones inespecíficas (misma señal que el blanco). Se deberían optimizar las condiciones de ensayo, así como evaluar la efectividad de funcionalización de las esferas para reducir la señal del blanco y así obtener un menor límite de detección.

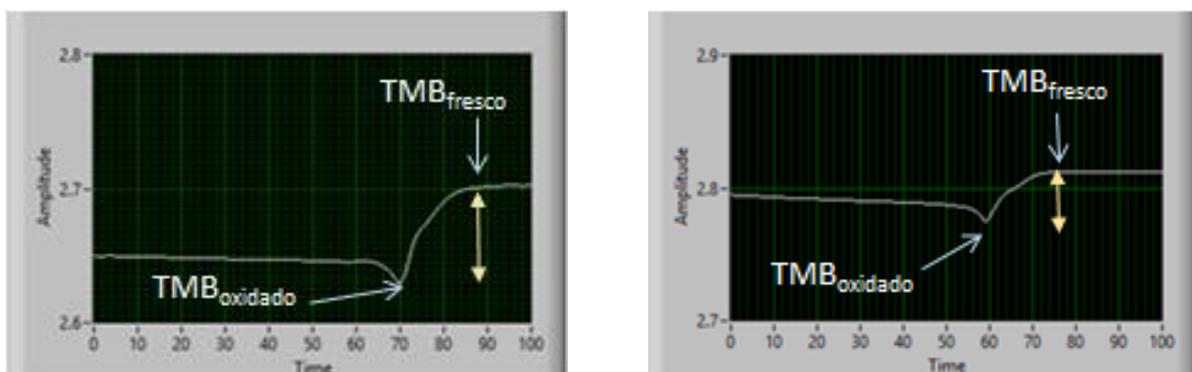


Figura 9: Capturas de pantalla de la interfaz de Labview. Señal analítica obtenida para las dos concentraciones testeadas. a) 3×10^8 UFC/ml. b) $1,2 \times 10^9$ UFC/ml.

Una de las teorías que se barajan sobre la ausencia de señal, es la posibilidad de que las hebras de ARN se hubiesen aglutinado debido a la gran cantidad de ARN total en la muestra. Si ese fuera el caso, el segmento de ARN 16S *target* no estaría expuesto para la hibridación.

Aunque no se hayan obtenido resultados satisfactorios con las muestras de *E. coli*, estos resultados son preliminares y queda mucho por estudiar, sobretodo en cuanto a la preparación de la muestra, hecho que permitiría obtener sin duda alguna, mejores resultados.

Las infecciones del tracto urinario son un problema tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, siendo una de las infecciones más diagnosticadas y tratadas con antibioterapia. La utilización de este microchip beneficiaría, por tanto, a ambas ramas sanitarias ya que podría conseguirse una detección precoz de la infección. Por otro lado, facilitaría la elección de un antibiótico adecuado para evitar la generación de resistencias y disminuir el grave problema que está repercutiendo en la salud pública. Por ello, es tan importante integrar varias ramas de distintas disciplinas para un mismo fin de cooperación en el marco de *One Health*.

Como todos los sistemas que aún se están poniendo a punto, éste también necesita mejorar ciertos aspectos como sería la incorporación de una etapa de preparación de la muestra, en este caso orina, facilitando un sistema de extracción del ARN para poder realizar el ensayo sin tener un paso previo fuera del chip; así como la introducción de antibióticos en el sistema para la realización de un antibiograma dentro del chip.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones finales de este trabajo se pueden resumir en las siguientes:

- A partir de los ensayos realizados se puede determinar que el límite de detección de las hebras de ADN es menor *on-chip* que en el lector ELISA, ya que, se han observado diferencias más significativas en la lectura de concentraciones consecutivas, por lo que el chip detecta cambios más pequeños.
- La velocidad de los ensayos *on-chip* es menor que *off-chip* gracias a una mayor relación superficie-volumen que nos permite acortar el tiempo de las incubaciones con un resultado idéntico.
- En este trabajo no se ha conseguido realizar con éxito la hibridación in-vitro de la cepa de *E.coli*. La hipótesis más plausible sería a causa de una saturación de RNA de la muestra por lo que se deberían de realizar más estudios para estandarizar la cantidad óptima de muestra para el funcionamiento del chip.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anger, J., Lee, U., Ackerman, A. L., Chou, R., Chughtai, B., Clemens, J. Q., ... Chai, T. C. (2019). Recurrent Uncomplicated Urinary Tract Infections in Women: AUA/CUA/SUFU Guideline. *Journal of Urology*, 1–8. <https://doi.org/10.1097/ju.0000000000000296>
- Au, A. K., Lai, H., Utela, B. R., & Folch, A. (2011). Microvalves and micropumps for BioMEMS. In *Micromachines* (Vol. 2). <https://doi.org/10.3390/mi2020179>
- Bent, S., Nallamotheu, 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>
- Bertoni, G., Pessacq, P., Graciela Guerrini, M., Calmaggi, A., Barberis, F., Jorge, L., ... Mykietiuk, A. (2017). *ETIOLOGÍA Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE LA INFECCIÓN NO COMPLICADA DEL TRACTO URINARIO*. 4, 304–308.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015, January 11). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 13, pp. 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Burmeister, A., Hilgers, F., Langner, A., Westerwalbesloh, C., Kerkhoff, Y., Tenhaef, N., ... Grünberger, A. (2019). A microfluidic co-cultivation platform to investigate microbial interactions at defined microenvironments. *Lab on a Chip*, 19(1), 98–110. <https://doi.org/10.1039/c8lc00977e>
- Chen, G., Svec, F., & Knapp, D. R. (2008). Light-actuated high pressure-resisting microvalve for on-chip flow control based on thermo-responsive nanostructured polymer. *Lab on a Chip*, 8(7), 1198–1204. <https://doi.org/10.1039/b803293a>
- Cueto M. (2005). Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 23(4), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.06.008>
- Díaz-González, M., Boix, G., Fernández-Sánchez, C., & Baldi, A. (2017). Wax microfluidics light-addressable valve with multiple actuation. *Smart Sensors, Actuators, and MEMS VIII*, 10246(May 2017), 102460G. <https://doi.org/10.1117/12.2264919>
- Echevarría-Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., & Osoreo-Plenge, F. (2006). Infección del tracto

- urinario y manejo antibiótico. *Acta Médica Peruana.*, 23(1), 26–31. Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172006000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Esfandiari, L., Wang, S., Wang, S., Banda, A., Lorenzini, M., Kocharyan, G., ... Schmidt, J. J. (2016). PCR-independent detection of bacterial species-specific 16S rRNA at 10 fM by a pore-blockage sensor. *Biosensors*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/bios6030037>
- Farfán, B. M. (2015). BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. *Revista Médica Clínica Las Condes*. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.007>
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Ávila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2110–2115. <https://doi.org/10.1128/JCM.02215-09>
- Flores-mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2016). *Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options*. 13(5), 269–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>.Urinary
- Herreros, M. L., Tagarro, A., García-Pose, A., Sánchez, A., Cañete, A., & Gili, P. (2018). Performing a urine dipstick test with a clean-catch urine sample is an accurate screening method for urinary tract infections in young infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 107(1), 145–150. <https://doi.org/10.1111/apa.14090>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.013>
- Koo, B., Yorita, A. M., Schmidt, J. J., & Monbouquette, H. G. (2018). Amplification-free, sequence-specific 16S rRNA detection at 1 aM. *Lab on a Chip*, 18(15), 2291–2299. <https://doi.org/10.1039/c8lc00452h>
- Lim, G. S., Chang, J. S., Lei, Z., Wu, R., Wang, Z., Cui, K., & Wong, S. (2015). A lab-on-a-chip system integrating tissue sample preparation and multiplex RT-qPCR for gene

- expression analysis in point-of-care hepatotoxicity assessment. *Lab on a Chip*, 15(20), 4032–4043. <https://doi.org/10.1039/c5lc00798d>
- Marques, A. G., Doi, A. M., Pasternak, J., Damascena, M. dos S., França, C. N., & Martino, M. D. V. (2017). Performance of the dipstick screening test as a predictor of negative urine culture. *Einstein (São Paulo)*, 15(1), 34–39. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082017ao3936>
- Marques, C., Belas, A., Franco, A., Aboim, C., Gama, L. T., & Pomba, C. (2018). Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 377–384. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx401>
- Mastali, M., Babbitt, J. T., Li, Y., Landaw, E. M., Gau, V., Churchill, B. M., & Haake, D. A. (2008). Optimal probe length and target location for electrochemical detection of selected uropathogens at ambient temperature. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2707–2716. <https://doi.org/10.1128/JCM.00423-08>
- Olin, S. J., & Bartges, J. W. (2015). Urinary Tract Infections. Treatment/Comparative Therapeutics. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.02.005>
- Walshaw, L., Yaschuk, Y., Isaacson, M., Link, H., Lee, L., Hrabok, D., ... Galenzoski, D. (2007). Evaluation of the Cult-Dip Plus dip slide method for urinary tract infection. *Journal of Clinical Pathology*, 48(8), 710–713. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.8.710>
- Ward, D. M., Weller, R., & Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured inhabitants in a well-studied natural community. *Nature (London)*, 345(6270), 63–65. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/345063a0>
- Wong, C., Epstein, S. E., & Westropp, J. L. (2015). Antimicrobial susceptibility patterns in urinary tract infections in dogs (2010-2013). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(4), 1045–1052. <https://doi.org/10.1111/jvim.13571>
- Zarei, M. (2017). Advances in point-of-care technologies for molecular diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.024>

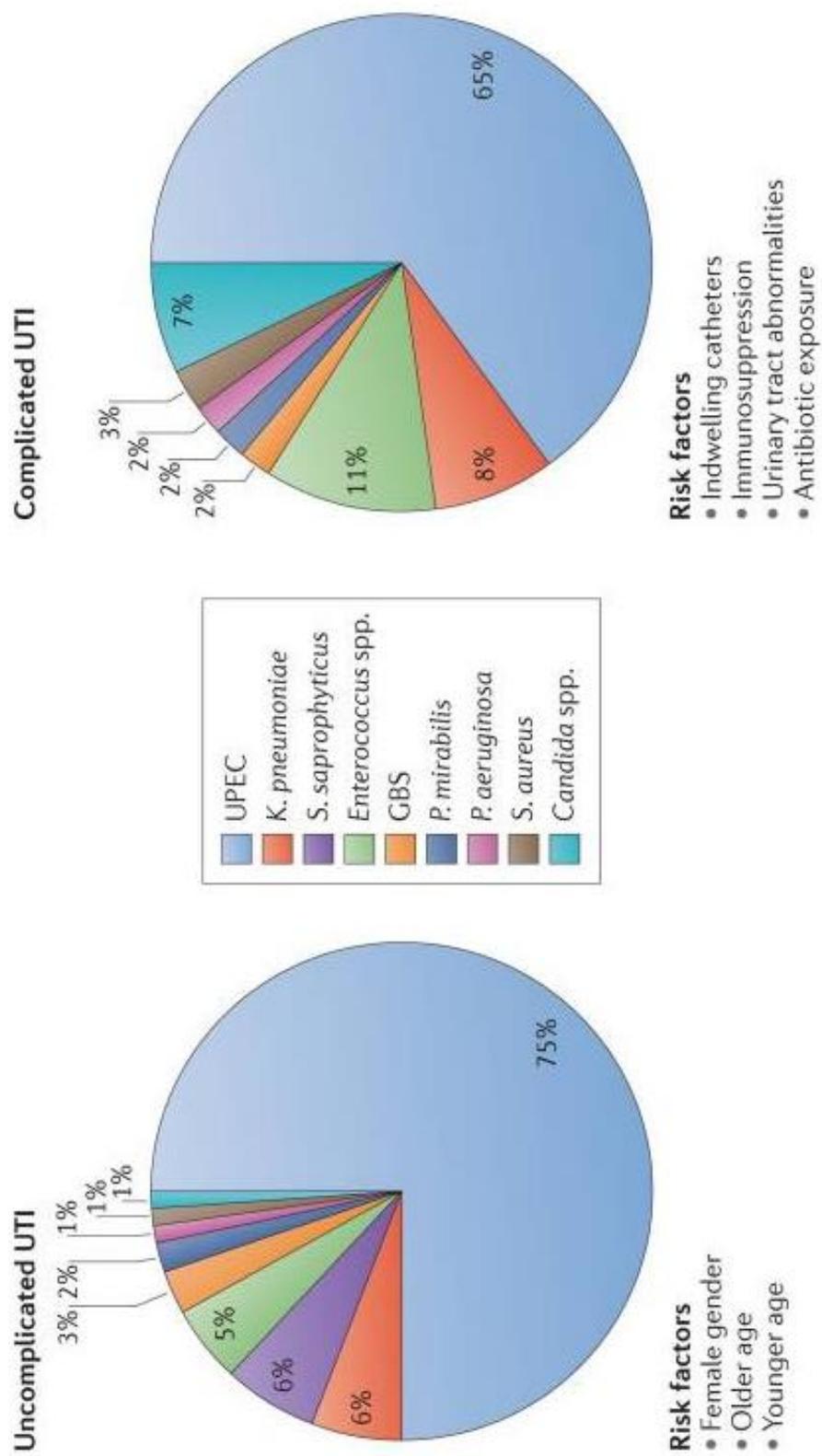


Figura 1: Epidemiología de las infecciones de tracto urinario no complicadas y complicadas en humanos (Flores-mireles et al., 2016).

	All Organisms % (n)	Pyelonephritis % (n)	Uncomplicated % (n)	Complicated % (n)	P Value
Total	(1636)	(86)	(522)	(1028)	
Gram positive	31.0 (508)	18.6 (16)	28.3 (148)	33.5 (344)	.04
<i>Staphylococcus</i> spp.	13.7 (224)	7.0 (6)	12.3 (64)	15.0 (154)	.75
<i>Enterococcus</i> spp.	13.4 (220)	9.3 (8)	12.3 (64)	14.4 (148)	.96
Other Gram positive ^a	3.9 (64)	2.3 (2)	3.8 (20)	4.1 (42)	.76
Gram negative	68.9 (1128)	81.4 (70)	71.6 (374)	66.5 (684)	.04
Enterics	65.1 (1065)	76.7 (66)	69.5 (363)	61.9 (636)	.006
<i>Escherichia coli</i>	52.4 (858)	58.1 (50)	57.7 (301)	49.3 (507)	.03
Non-hemolytic	29.9 (489)	27.9 (24)	29.3 (153)	30.3 (312)	.14
Hemolytic	22.7 (371)	30.2 (26)	28.4 (148)	19.0 (195)	.003
<i>Proteus mirabilis</i>	5.4 (89)	7.0 (6)	5.9 (31)	5.1 (52)	.20
<i>Enterobacter</i> spp.	1.8 (29)	7.0 (6)	1.3 (7)	1.6 (16)	.66
<i>Klebsiella</i> spp.	3.7 (61)	3.5 (3)	2.9 (15)	4.2 (43)	.09
Other gram negative enterics ^b	1.7 (28)	1.1 (1)	1.7 (9)	1.8 (18)	1.0
Non-enterics	3.9 (63)	4.7 (4)	2.1 (11)	4.7 (48)	.005
<i>Pseudomonas</i> spp.	2.0 (33)	2.3 (2)	1.5 (8)	3.6 (37)	.01

Nonenterics: *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Pasteurella* spp., *Providencia rettgeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

^a *Aerococcus viridans*, *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp.

^b *Citrobacter* spp., *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*.

Figura 2: Identificación bacteriana en ITUs en perro, clasificadas como no complicadas, complicadas y pielonefritis. El valor *p* está basado en el test de *Fisher* para diferenciar la proporción de aislados en no complicadas y complicadas (Wong et al., 2015)

Protocolo de hibridación ADN off-chip:

Día 1: Modificación de las esferas carboxiladas con la hebra captura EC (RK) + bloqueo (esferas 0.625%)

- **Limpieza/condicionamiento de las esferas:** 125µL de las esferas carboxiladas (2.5 %) a 500µL de MES (50mM) pH6
2-3 etapas de centrifugación en MES (50mM) pH6
- **Modificación:** Incubar 2h con agitación (T^a ambiente) con 500µL de EDC (2 mg/mL) en MES (50mM) pH6 y 20 uL de hebra captura EC (RK) (100 µM).
Limpieza: 2-3 etapas de centrifugación en MES (50mM) pH6 + 1-2 etapas de centrifugación en PBST 0.05%.
- **Bloqueo:** 500µL PBST-BSA 1% (1h T^a ambiente/overnight 4°C). Bloquear 2 eppendorfs de más (sin esferas).

Día 2: Hibridación

- **Limpieza:** 1-2 etapas de centrifugación en PBST + 1-2 etapas de centrifugación en 2XSCC. Limpiar también los 2 eppendorfs bloqueados.
Dividir las esferas (volumen total 500 µL) en dos eppendorfs (250 µL de esferas 0.625% cada uno): blanco y señal.
- **Reacción hebra target EC (RK) (30 min, agitación, T^a ambiente):**
Señal: añadir 250 µL de target (1 µM). Hebra target madre (100 µM). 10 µL de la madre a 1 mL de 2XSCC: 1µM.
Blanco: añadir 250 µL de buffer de hibridación sin hebra.
Volumen final 500 µL
- **Limpieza:** 2-3 etapas de centrifugación en 2XSCC.
- **Reacción hebra detectora EC (RK) (30 min, agitación, T^a ambiente):** ambos eppendorfs 500 µL de hebra detectora (1 µM)
Hebra detectora madre (100 µM). 10 µL de la madre a 1 mL de 2XSCC: 1µM.
- **Limpieza:** 1-2 etapas de centrifugación en 2XSCC + 1-2 etapas de centrifugación en PBST.
- **Reacción streptavidina-biotina:** Incubar 1h (T^a ambiente y agitación) en 500µL de streptavidina-HRP dilución 1:5.000 en PBST

Limpieza: 1-2 etapas de centrifugación en PBST + 1-2 etapas de centrifugación en citrato. Volumen final 500 μ L

- **Reacción enzimática:** 200 μ L de muestra/blanco + 100 μ L de TMB sustrato. Tiempo: 5 -15 min
- **Parada reacción enzimática:** 100 μ l H₂SO₄ (2M). Centrifugamos para coger el sobrenadante (color amarillo)
- **Lectura:** 100 μ l sobrenadante en pocillos ELISA (3x). Lectura a color amarillo: 450 nm.