

Desarrollo de un dispositivo médico
tipo *Point of Care* para la detección
rápida de infección urinaria y
sensibilidad antibiótica en países en vías
de desarrollo



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Doctorado en Medicina

Doctorando: Jorge Jover García

Director de la Tesis: Javier Colomina Rodríguez

Septiembre 2020



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de un dispositivo médico tipo *Point of Care* para la detección rápida de infección urinaria y sensibilidad antibiótica en países en vías de desarrollo

Autor: D. Jorge Jover García

Licenciado en Farmacia por la Universidad de La Laguna. Facultativo Especialista en Microbiología y Parasitología Clínica.

Septiembre 2020

Desarrollo de un dispositivo médico tipo *Point of Care* para la detección rápida de infección urinaria y sensibilidad antibiótica en países en vías de desarrollo

Autor: D. Jorge Jover García

Licenciado en Farmacia por la Universidad de La Laguna. Facultativo Especialista en Microbiología y Parasitología Clínica.

Director de Tesis: D. Javier Colomina Rodríguez

Doctor en Microbiología. Facultativo Especialista en Microbiología y Parasitología Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Tutor de Tesis: D. David Navarro Ortega

Catedrático del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

D. Javier Colomina Rodríguez, Doctor en Microbiología y Facultativo especialista de Microbiología y Parasitología Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Desarrollo de un dispositivo médico tipo *Point of Care* para la detección rápida de infección urinaria y sensibilidad antibiótica en países en vías de desarrollo”, realizado por el Ldo. Jorge Jover García, se ha llevado a cabo bajo su dirección y ha sido supervisado y aprobado para su presentación como Tesis Doctoral con el objetivo de obtener por parte de éste el grado de Doctor atendiendo a la normativa prevista en el Programa de Doctorado en Medicina de la Universidad de Valencia.

Y para que conste, firma el presente certificado en Valencia, a Septiembre de 2020,



Javier Colomina Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas, que de una manera u otra, han depositado su “granito de arena” para ayudarme a cumplir un sueño. Por ello, deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Javier Colomina, mi “mentor” en el mundo de la Microbiología, por su confianza durante todo este tiempo. Por ser un ejemplo constante de trabajo, exigencia y liderazgo, que ha permitido completar el exigente camino iniciado hace ya, cinco años.

A Mario Soto y Sara Droguett, porque sin ellos, esta aventura nunca hubiese comenzado. Por su confianza en mis posibilidades durante estos años de colaboración, y por su calidad humana y emprendedora, con el fin de mejorar el bienestar y la salud de los demás.

A todo el grupo de trabajo que ha participado en el Proyecto, especialmente a: Andrés Díaz Lantada, Pilar Lafont Morgado, Paloma Oliver Sáez, Elena López Camacho, Jesús Mingorance Cruz y María Muñoz Algarra. Por su entusiasmo, esfuerzo y entrega en el desarrollo del dispositivo *Point of Care*.

A mi abuelo Saturnino, quién siempre festejó como nadie mis pequeños triunfos profesionales.

A mis padres, Jorge y Begoña, y a mi hermano Borja, por su infinita paciencia y apoyo, porque sin ellos, no hubiese conseguido completar otra etapa de mi vida. Por ser un pilar fundamental en el que sustentar todas mis ilusiones y metas.

PREFACIO

La fabricación y comercialización de dispositivos médicos se ha convertido en los últimos años en uno de los mercados más potentes a nivel mundial. Este crecimiento debe continuar para cubrir las carencias derivadas de los factores demográficos, entre los que destaca el aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados, la creciente natalidad y el difícil acceso a las necesidades básicas en los países subdesarrollados.

La evolución de esta industria ha estado favorecida por el desarrollo en paralelo de la tecnología, así como, la optimización de costes y plazos en el desarrollo de productos sanitarios.

Todos los avances realizados en este sector, deben de emplearse de forma combinada para dar respuesta a patologías emergentes y complementar los métodos clínicos y analíticos convencionales. No obstante, con el fin de garantizar el crecimiento mencionado, es necesario dar continuidad a los avances científicos-tecnológicos para proporcionar nuevas habilidades que permitan desarrollar dispositivos más eficientes y de bajo costo.

Para cumplir con esta misión, resulta necesario desarrollar nuevos dispositivos médicos que permitan integrar varias funciones propias de un laboratorio en un único dispositivo de reducidas dimensiones (*lab on a chip*). Idea, que ha tenido un gran calado en los últimos años, y que ha permitido a este sector alcanzar una importante expansión a nivel mundial a corto plazo.

El colegio Americano de Patólogos define POC como “*pruebas diseñadas para su uso junto o cerca del paciente, que no requieren un espacio permanente y realizadas fuera de las instalaciones del laboratorio clínico*”.

Esta Tesis Doctoral está destinada a realizar una propuesta de metodología estructurada para el desarrollo de un dispositivo médico *Point of Care* (POC) para la detección de infección urinaria y antibiograma rápido en países en vías de desarrollo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IX
PREFACIO	XI
RESUMEN	XVII

1.- INTRODUCCIÓN:

1.1.- Marco científico.	1
1.2.- Importancia de la Tesis Doctoral y Justificación.	2
1.2.1.- Importancia industrial.	2
1.2.2.- Importancia social.	3
1.3.- Marco Institucional.	4
1.3.1.- Universidad Politécnica de Madrid.	4
1.3.2.- Universidad de Valencia.	4
1.3.3.- Colaboraciones externas.	5
1.4.- Infección urinaria.	6
1.4.1.- Etiología.	7
1.4.2.- Antibióticos.	7
1.5.- Importancia del laboratorio de Microbiología y del diagnóstico microbiológico.	11
1.6.- Problemática en países no industrializados.	14
1.6.1.- Diagnóstico microbiológico.	14
1.6.2.- Infección urinaria y resistencias antibióticas.	15
1.7.- Necesidad del diagnóstico rápido en microbiología.	17
1.7.1.- Sepsis.	17
1.7.2.- Infecciones respiratorias.	18
1.7.3.- Meningitis y encefalitis.	19
1.7.4.- Infecciones de transmisión sexual.	20
1.7.5.- Infección urinaria.	21
1.8.- Antibiograma en microbiología.	22
1.8.1.- Métodos convencionales: ventajas e inconvenientes.	22
1.8.2.- Métodos rápidos.	23
1.9.- Elaboración de dispositivos <i>Point of Care</i> .	34
1.9.1.- Fases del proceso de desarrollo sistemático de un producto.	34
1.9.2.- Materiales: Ventajas del plástico.	43
1.9.3.- Normativa en el desarrollo de dispositivos médicos.	44

2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	57
--	----

3.- MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1.- Desarrollo estructural del dispositivo POC para la detección de infección urinaria y antibiograma rápido.	61
3.2.- Guía para la industria y la FDA.	83
3.3.- Cálculo del inóculo bacteriano del dispositivo POC-ITU.	93
3.4.- Impregnación del dispositivo.	97
3.4.1.- Proceso de impregnación estándar.	97
3.4.2.- Reactivos utilizados en el proceso de impregnación.	100
3.4.2.1.- Medios de cultivo.	100
3.4.2.2.- Indicadores de crecimiento bacteriano.	103
3.4.2.3.- Antibióticos.	106
3.4.2.4.- Otros reactivos.	109
3.4.3.- Cálculo de las concentraciones críticas de antibiótico.	110
3.4.3.1.- Ensayos con amoxicilina/ácido clavulánico.	110
3.4.3.2.- Ensayos con el resto de antibióticos.	114
3.4.4.- Tiempo de secado.	116
3.4.5.- Protocolo de impregnación del dispositivo POC-ITU.	118
3.5.- Tiempo de lectura del dispositivo.	122
3.6.- Interpretación de resultados del dispositivo POC-ITU.	124
3.7.- Ensayos de validación.	126
3.7.1.- Ensayo de validación multicéntrico.	126
3.7.2.- Ensayo de validación a “pie de campo” (Zanzíbar).	127

4.-RESULTADOS:

4.1.- Cálculo del inóculo bacteriano del dispositivo POC-ITU.	129
4.2.- Cálculo del inóculo bacteriano a partir de muestras de orina directa.	129
4.3.- Impregnación del dispositivo.	131
4.3.1.- Reactivos utilizados en el proceso de impregnación.	131
4.3.1.1.- Medios de cultivo. Resultados de los ensayos de productividad y pH.	131
4.3.1.2.- Resultados de los ensayos con los distintos indicadores de crecimiento bacteriano.	132
4.3.1.3.- Ensayos “ <i>in vitro</i> ” de los distintos antibióticos.	134
4.3.2.- Resultados del ensayo para la determinación del tiempo de secado.	175
4.4.- Resultados del ensayo para la determinación del tiempo de lectura del dispositivo POC-ITU.	175
4.5.- Resultados de los ensayos de validación “ <i>in vivo</i> ”.	176
4.5.1.- Ensayo de validación multicéntrico.	176
4.5.2.- Ensayo de validación a “pie de campo” (Zanzíbar).	190

5.- DISCUSIÓN:	
5.1.- Consecución de los objetivos planeados.	191
5.2.- Análisis de las tecnologías empleadas durante el desarrollo de la Tesis Doctoral.	192
5.3.- Análisis de las soluciones diagnósticas y terapéuticas propuestas.	193
5.4.- Análisis de las soluciones propuestas en países en vías de desarrollo.	206
5.5.- Análisis de las soluciones propuestas para la reducción del consumo de antibióticos.	210
5.6.- Análisis de la metodología propuesta.	212
5.7.- Análisis de los materiales empleados.	215
5.8.- Líneas de actuación futura.	217
5.8.1.- Actuaciones futuras en relación a los materiales estudiados.	218
5.8.2.- Actuaciones futuras en relación con la patología estudiada.	220
6.- CONCLUSIONES.	223
7.- BIBLIOGRAFÍA.	225
8.- ANEXOS:	
8.1.- Lista de figuras.	245
8.2.- Lista de tablas.	253
8.3.- Lista de abreviaturas y acrónimos.	257
8.4.- Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral.	259
8.5.- Hoja de recogida de datos (estudio multicéntrico).	261

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral, está enfocada al desarrollo de un nuevo dispositivo médico *Point of Care* (POC), basado en el empleo de reactivos cromóforos (violeta de tetrazolio) para la detección colorimétrica de bacteriuria significativa y, en los casos positivos, determinar su categoría Gram y perfil de resistencia a diversos antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de la infección del tracto urinario (ITU).

Las ITUs son una de las infecciones más prevalentes en el ámbito comunitario. Estas infecciones representan una elevada carga asistencial y económica para la salud pública y la sociedad.

Como en otros procesos infecciosos, el tratamiento inicial de la ITU es habitualmente empírico. La demora del informe microbiológico o la inaccesibilidad a laboratorios de Microbiología, como ocurre en los países con grandes desigualdades sociales, son algunas de las causas que apremian al clínico a pautar un tratamiento antibiótico antes de conocer los resultados de los análisis microbiológicos.

Si a esto le sumamos el incremento de las resistencias antibióticas de los principales microorganismos uropatógenos, las posibilidades de pautar un tratamiento antibiótico erróneo aumentan considerablemente, derivando en fracaso terapéutico, comprometiendo la vida del paciente, y aumentando el consumo y uso inadecuado de los antimicrobianos.

Por ello, mediante un proyecto de investigación subvencionado por el Gobierno de Chile (<https://www.corfo.cl>), y en colaboración con un equipo multidisciplinar formado por Ingenieros técnicos y Microbiólogos, se ha diseñado, patentado, fabricado, desarrollado y validado mediante ensayos *in vivo*, un dispositivo médico POC para la detección de ITU y antibiograma rápido en países en vías de desarrollo. Al disponer de esta tecnología, se puede ofrecer al mercado un dispositivo que no requiere de equipamiento sofisticado, tal y como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS). En comparación con las técnicas de rutina empleadas para el diagnóstico de ITU en un laboratorio de Microbiología, el dispositivo ofrece una reducción notable de los tiempos de respuesta, lo que puede tener un gran impacto clínico y económico. Su bajo coste, permitiría abrir una vía de esperanza en países con grandes desigualdades sociales, donde gran parte de la población, difícilmente puede acceder a un laboratorio de Microbiología.

ABSTRACT

This Doctoral Thesis is focused on the development of a new *Point of Care* (POC) medical device based on the use of chromophoric reagents (tetrazolium violet) for the colorimetric detection of significant bacteriuria; in positive cases, their Gram category and resistance profile to various antibiotics commonly used in the treatment of urinary tract infection (UTI) is determined.

UTIs are one of the most prevalent infections in the community setting. These infections represent a high care and economic burden for public health and society.

As in other infectious processes, the initial treatment of UTIs is usually empirical. The delay of the microbiological report or the inaccessibility to Microbiology laboratories, as occurs in countries with great social inequalities, are some of the causes that urge the clinician to prescribe an antibiotic treatment before knowing the results of the microbiological analysis.

Furthermore, the increase in antibiotic resistance of the main uropathogenic microorganisms increases the possibilities of prescribing an incorrect antibiotic treatment, leading to therapeutic failure, compromising the patient's life, and increasing the consumption and use of antibacterial agents. Thus, a POC medical device for detection of UTI and rapid antibiogram in developing countries has been designed, patented, manufactured, developed and validated by *in vivo* tests, through a research project supported by the Government of Chile (<https://www.corfo.cl>), and in collaboration with a multidisciplinary team consisting of technical engineers and microbiologists. Using this technology, a device with no sophisticated equipment requirement can be offered to the market, as the World Health Organization (WHO) recommends. Compared to the routine techniques used for ITU diagnosis in a Microbiology laboratory, the device offers a remarkable reduction in response times, resulting in a great clinical and economic impact. Its low cost opens a path of hope in countries with great social differences, where a large part of the population can hardly access a Microbiology laboratory.

1.- INTRODUCCIÓN:

1.1.- MARCO CIENTÍFICO

El desarrollo científico y tecnológico en diversas disciplinas lleva a un constante progreso que permite que áreas antes claramente diferenciadas trabajen conjuntamente dando lugar a nuevos campos de estudio. Dichos campos, requieren conocimientos de distinta índole y necesitan de la estrecha colaboración entre los distintos especialistas que los constituyen, formando así, equipos de trabajo multidisciplinarios.

Uno de los más destacados ejemplos de este proceso de trabajo conjunto entre distintas especialidades, lo encontramos en la relación que existe entre Ingeniería y Medicina, o de una forma más amplia, entre Ingeniería y Ciencias de la Salud (incluyendo Biología, Bioquímica, Medicina, Microbiología, Farmacia y otras disciplinas), que ha dado lugar al término de “Ingeniería Biomédica”, área del conocimiento que se ocupa de la aplicación de principios de la Ingeniería y de procedimientos de diseño para resolver problemas médicos.

Es exactamente en esta combinación entre Ingeniería y Microbiología donde se desarrollan las investigaciones de esta Tesis Doctoral en la cual participan a su vez distintas disciplinas como la Ingeniería Mecánica y la Salud, las cuales se describen a continuación.

Ingeniería mecánica

La Ingeniería Mecánica es una disciplina que implica el uso de principios físicos para el análisis, diseño, fabricación, ensayo y mantenimiento de sistemas mecánicos. Tradicionalmente ha sido la rama de la Ingeniería que, mediante la aplicación de dichos principios, ha permitido la creación de dispositivos útiles como herramientas, máquinas y productos.

Es un área importante de la Tesis Doctoral, ya que parte de las investigaciones realizadas se basan en el empleo de distintas herramientas de diseño y fabricación, asistidas por ordenador, utilizadas con el fin de dar forma al dispositivo *Point of Care* para la detección de ITU y antibiograma rápido (POC-ITU).

Salud

Disciplina científica que persigue generar conocimiento para preservar la salud y el bienestar de la ciudadanía, así como para el desarrollo de diferentes aspectos preventivos, diagnósticos, curativos, rehabilitadores y paliativos de las patologías que afectan al ser humano.

Es el área central de la Tesis Doctoral, ya que la mayor parte de las investigaciones van orientadas a desarrollar un dispositivo capaz de favorecer el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria, aspectos enmarcados en esta disciplina.

1.2.- IMPORTANCIA DE LA TESIS DOCTORAL Y JUSTIFICACIÓN

1.2.1.- Importancia industrial

La presente Tesis Doctoral está en gran medida orientada a favorecer la expansión industrial de los dispositivos *Point of Care*, gracias al establecimiento de una metodología estructurada de desarrollo que facilite la integración de distintas funciones de un laboratorio en un dispositivo de reducidas dimensiones.

Para la consecución de dicho objetivo, se estructura la investigación en torno al desarrollo de un dispositivo que emplea una sustancia cromófora (violeta de tetrazolio) como indicador de crecimiento bacteriano para el diagnóstico de infección urinaria y detección de resistencias bacterianas.

Este dispositivo surge como respuesta alternativa a necesidades médicas reales, y los aprendizajes obtenidos en su desarrollo fomentan otras numerosas aplicaciones de los dispositivos POC. Dichos aprendizajes están relacionados con las distintas etapas de integración de un proceso microbiológico en un sistema miniaturizado, y por tanto, la necesidad de caracterizar sus propiedades, diseñar y fabricar prototipos, ensayos *in vivo*, evaluación de seguridad y propuesta de nuevas aplicaciones.

Por otro lado, el sector en el que se engloban las investigaciones, la industria de los dispositivos médicos, se ha convertido en la última década en una de las más potentes y con mayor crecimiento anual, potenciada por numerosos progresos científicos y

tecnológicos que se explican de forma detallada en los siguientes apartados. Un mercado mundial que supera los 200 billones de euros y un crecimiento en torno al 8%, según fuentes recientes, son cifras que ayudan a valorar la relevancia económica de dicha industria.

1.2.2.- Importancia social

Todo dispositivo médico tiene como principal finalidad salvaguardar la salud del ser humano en el aspecto preventivo, diagnóstico o terapéutico, por lo que los productos de esta creciente industria inciden de forma directa en la calidad de vida de sus usuarios.

El continuo desarrollo científico-tecnológico potencia las mejoras de esta industria, proporcionando nuevas alternativas diagnósticas o terapéuticas.

La importancia social de esta industria puede percibirse también en base a datos macroeconómicos, como el hecho de que el gasto promedio en salud en los países de la Unión Europea representa cifras cercanas al 10% del P.I.B. Dentro de dicho gasto, un 7% aproximadamente, corresponde directamente a dispositivos médicos, según un informe de la Universidad de Florencia para la Comisión Europea (Pammolli et al., 2005).

Por otro lado, la población activa en dicho sector industrial supera los 350.000 trabajadores en países de la Unión Europea, lo que muestra también un aspecto determinante a la hora de valorar la importancia social de esta industria, aparte de los millones de personas en todo el mundo que han superado dolencias mortales y sobreviven gracias a los beneficios que proporcionan todo tipo de dispositivos médicos. En relación con la prevalencia de la infección urinaria, para la que se plantean nuevas posibilidades diagnósticas y terapéuticas en este trabajo, se pueden adelantar ciertos datos que ayudan a comprender la importancia social del estudio planteado:

- Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las infecciones más prevalentes en la comunidad (Sivick et al., 2010). Estas infecciones representan una carga para la salud pública y la sociedad, pues cerca del 40% de las mujeres, y el 12% de los hombres, tendrán al menos un caso de ITU durante su vida adulta (Foxman B., 2002). La infección se asocia con altas tasas de recurrencia y, si no se instaura un manejo antibiótico adecuado, puede progresar

rápidamente a sepsis severa e incrementar la morbimortalidad de los pacientes (Suárez et al., 2005).

Nuevas estrategias en la aproximación a esta patología, en base al empleo de dispositivos POC, están avaladas por la gran repercusión social, sanitaria y económica que conllevan.

1.3.- MARCO INSTITUCIONAL

1.3.1.- Universidad Politécnica de Madrid

Parte de la investigación realizada se ha llevado a cabo en el Departamento de Investigación en Ingeniería de Máquinas de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

La Universidad Politécnica de Madrid es una universidad pública fundada en 1971 como agrupación de diversos centros docentes y escuelas técnicas adscritas anteriormente a distintos organismos. Es la única universidad que imparte exclusivamente titulaciones técnicas en la Comunidad de Madrid y es especialmente valorada por su calidad y exigencia docente. Cuenta con un total de 43 titulaciones y alrededor de 3.400 profesores que se ocupan de la docencia de unos 35.000 alumnos, siendo por tanto la mayor universidad técnica presencial de España.

1.3.2.- Universidad de Valencia

La Universidad de Valencia, fundada en 1499 bajo el nombre de *Estudi General*, es una de las universidades más antiguas de España. Es una universidad pública, orientada a la docencia e investigación en casi todos los ámbitos del saber. Desarrolla una intensa labor investigadora a través de los departamentos académicos de cada Facultad, sus Institutos Universitarios de Investigación o el Parque Científico de la Universidad de Valencia. Imparte 58 estudios de grado y 11 dobles titulaciones, además de 117 másteres oficiales y 59 Doctorados adaptados al Espacio Europeo de Educación Superior.

1.3.3.- Colaboraciones externas

- **Servicio de Microbiología Hospital Universitario de la Ribera (HULR)**

El HULR fue creado en el año 1999 y su Servicio de Microbiología atiende a todas las solicitudes relacionadas con la especialidad, procedentes de atención especializada (Hospital) y de atención primaria (Centros de Salud). Es una unidad integrada en la denominada Área de Diagnóstico Biológico (ADB) del HULR, pero funcionalmente independiente, diferenciada y autónoma, con nominación específica y categoría de “Servicio”.

- **Servicio de Microbiología Hospital Universitario La Paz (HULP)**

El HULP fue fundado en 1964. Se trata de un centro hospitalario de titularidad pública, administrado por el Servicio Madrileño de Salud, dependiente de la Consejería de Sanidad y es uno de los principales hospitales de referencia de España. El grupo de investigación en Microbiología Molecular está integrado en el Servicio de Microbiología, y buena parte de sus miembros son facultativos del Servicio con actividad asistencial. Esto condiciona el planteamiento estratégico del grupo, y por ello, las diversas líneas de investigación giran en torno a diferentes aspectos de la microbiología clínica o la patología infecciosa.

- **Servicio de Microbiología Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUPH)**

El Servicio de Microbiología del HUPH, forma parte de un complejo hospitalario de primer nivel que presta servicio asistencial al “Área 6 de Salud” de la Comunidad de Madrid. Se trata de un Servicio acreditado para la formación sanitaria especializada que colabora en la docencia de pregrado, junto con el Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad

Autónoma de Madrid. Asimismo, participa de forma activa en distintos ensayos clínicos y estudios multicéntricos.

- **Diagnochip®**

Empresa fundada en el año 2012 por Mario Soto y Sara Droguett, con el propósito de contribuir en la gestión de proyectos relacionados con Ciencia, Tecnología y Salud, y mejorar la calidad de vida de las personas, especialmente las más vulnerables. El objetivo de la empresa se enfoca en el diseño, desarrollo y comercialización de dispositivos médicos, que simplifiquen los procesos de diagnóstico y faciliten el tratamiento de diversas enfermedades en el punto de atención del paciente, tal y como recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS).

- **Laboratorios TACSA**

Laboratorios TACSA SL es fundado en el año 2003. Ubicado en el Polígono Industrial de Catarroja (Valencia), posee unas modernas instalaciones y equipamiento de laboratorio de última generación, donde se realizan ensayos de laboratorio, cursos de formación, servicios de consultoría de calidad y medioambiente. Cuenta con un conjunto de personas, con experiencia individual y colectiva que constituyen la columna vertebral de la Organización, en la que destaca su equipo multidisciplinar formado por farmacéuticos, biólogos, químicos, tecnólogos de alimentos, técnicos medioambientales, técnicos agrícolas y técnicos de laboratorio. Además, participa en grupos de proyectos de I+D+I, siendo una seña de identidad de la empresa.

1.4.- INFECCIÓN URINARIA

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las enfermedades infecciosas más frecuentes en la práctica clínica. Un tercio de las visitas a las consultas de Atención Primaria son por procesos infecciosos (Llor et al., 2010). De estos, un 10% son ITU (Junquera et al., 2005). Si contabilizamos los pacientes que se tratan por sí mismos y los que acuden a urgencias hospitalarias y ambulatorias, nos hacemos una idea de la magnitud de esta patología y del consumo de antibióticos que conlleva.

1.4.1.- Etiología

La invasión del aparato genitourinario está restringida a un determinado grupo de microorganismos, y la prevalencia de unos microorganismos u otros va a depender del paciente y sus enfermedades de base. Las causas de ITU se ven modificadas por factores como la edad, la diabetes, obstrucción del tracto urinario, lesiones de médula espinal o sondaje vesical (Andreu et al., 2008; Ronald A., 2002). Por eso, determinados microorganismos que rara vez están implicados en un episodio de ITU en población sana, pueden ser causa de infección en pacientes con alteraciones anatómicas, metabólicas o inmunológicas (Ronald A., 2002). La estancia hospitalaria y el uso prolongado de antibióticos también van a condicionar la prevalencia de unos microorganismos u otros.

El principal agente causal (75-95%) de ITU es *Escherichia coli*. *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus spp.* son responsables de la gran mayoría de episodios restantes (Junquera et al., 2005; Ronald A., 2002).

Por otro lado, en casos de ITU recurrente y complicada, el principal agente causal continúa siendo *Escherichia coli*. Sin embargo, la prevalencia de microorganismos como *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.* e incluso *Staphylococcus spp.*, adquiere mayor relevancia en estos episodios de infección repetitiva (Palou et al., 2011). En presencia de anomalías anatómicas del aparato genitourinario, no es infrecuente aislar más de un microorganismo en el urinocultivo. En estos pacientes es frecuente la instrumentación del tracto urinario y tratamiento antibiótico prolongado, lo que hace que las bacterias aisladas sean más resistentes de lo habitual (Livermore et al., 2007).

1.4.2.- Antibióticos

El tratamiento de la ITU depende de muchos factores que condicionan la elección del antibiótico. Se requiere de antibióticos con una alta eficacia sobre el agente infeccioso, que tengan una buena distribución corporal, alta concentración en las vías urinarias y parénquima renal, además de baja toxicidad. El objetivo del tratamiento debe ser la obtención de una respuesta rápida y efectiva, prevenir las recurrencias y evitar el

incremento de resistencias bacterianas a los antibióticos (Wagenlehner et al., 2006; Mulholland SG., 1990).

Los antibióticos beta-lactámicos son frecuentemente utilizados en el tratamiento de la ITU. Se trata de antibióticos tiempo-dependiente, es decir, su eficacia está condicionada por el tiempo en que su concentración permanece por encima de su concentración mínima inhibitoria. Por tanto, una posología inadecuada puede ser causa de fracaso terapéutico (Frimodt-Moller N., 2002; Wagenlehner et al., 2006). Por otro lado, la eficacia de los antibióticos concentración-dependiente como las quinolonas, está supeditada a una dosis que garantice una concentración adecuada en el foco de infección (Frimodt-Moller N., 2002).

En el caso de la pielonefritis no complicada, la vía oral debería ser considerada en pacientes con sintomatología leve o moderada, ausencia de condiciones mórbidas concomitantes y que puedan tolerar esta vía de administración. Debido a la creciente resistencia de *E.coli* a ampicilina, amoxicilina y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, estos antibióticos no deberían de ser usados en el tratamiento empírico de la pielonefritis (Millar et al., 1997; Orenstein et al., 1999; Hooton et al., 1997). En estos casos, el tratamiento empírico con fluorquinolonas, constituye el tratamiento de elección, porque son útiles tanto en la ITU complicada como no complicada. No obstante, el uso de fluorquinolonas como tratamiento terapéutico de primera línea en la ITU baja no complicada debería estar restringido solamente a aquellos pacientes con intolerancia al cotrimoxazol, los que tienen una frecuencia alta de resistencia antibiótica debido a un tratamiento antibiótico reciente, o los que residen en áreas donde la resistencia a cotrimoxazol es elevada (Orenstein et al., 1999).

El cotrimoxazol es uno de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de la ITU con excelentes resultados en cuanto a eficacia y tasas de recurrencia (Nicolle L., 2002). Algunos ensayos han demostrado que su eficacia en un régimen terapéutico de siete días es equiparable a tres días con quinolonas (Arredondo-García et al., 2004). No obstante, hay países en donde las resistencias locales a este antibiótico alcanzan el 20%, por lo que su recomendación como tratamiento empírico está limitada (Gupta et al., 1999; Kahlmeter G., 2003).

El tratamiento con cotrimoxazol en una ITU causada por microorganismos resistentes al mismo, obtienen unas tasas de curación <60% (Miller et al., 2004). No obstante, en algunos lugares con tasas de resistencia a cotrimoxazol del 10-15%, el antibiótico muestra una eficacia similar al del resto de antibióticos. Las guías americanas y

europeas desaconsejan el tratamiento empírico con cotrimoxazol cuando las tasas de resistencia local de *E.coli* para este antibiótico son mayores del 20% (Warren et al., 1999) o cuando el paciente haya sido tratado con el mismo en los últimos 3 meses. En España, las guías terapéuticas excluyen el cotrimoxazol como tratamiento empírico de las infecciones urinarias dado que las tasas de resistencia de los principales microorganismos uropatógenos son superiores al 30% (Pigrau et al., 2002; Lorente et al., 2005).

Las fluorquinolonas son activas frente a la mayoría de microorganismos uropatógenos. No obstante, se trata de una familia de antibióticos que no está exenta de las crecientes resistencias bacterianas a nivel mundial. Su excelente biodisponibilidad permite su uso vía oral, alcanzando concentraciones en el tracto urinario superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del agente infeccioso.

Las tasas de erradicación, recurrencias y efectos secundarios de las quinolonas son similares a cotrimoxazol (Hooton et al., 1989; Petersen et al., 1990). No obstante, presentan un intervalo terapéutico más corto y su eficacia es superior a los antibióticos del grupo de los beta-lactámicos (Jonsson et al., 1990; Sandberg et al., 1990; Hooton et al., 2005).

Series recientes confirman el aumento de las resistencias a fluorquinolonas en España (Kahlmeter G., 2003). No obstante, el porcentaje de fracaso terapéutico en el tratamiento de la ITU no complicada es bajo, probablemente por la elevada concentración que alcanza el antibiótico en orina. Por ello, el uso de quinolonas como tratamiento empírico de la ITU se considera una opción útil en zonas con bajas tasas de resistencia.

La utilización frecuente de fluorquinolonas se ha correlacionado con un aumento de las resistencias a este antibiótico (Killgore et al., 2004). Debido a su farmacocinética, son muy eficaces en infecciones urinarias con afectación parenquimatosa y sistémica, de modo que en la ITU baja estarían desaprovechadas. Por este motivo, algunos autores desaconsejan su utilización como primera alternativa en las infecciones urinarias bajas no complicadas (Hooton et al., 2004).

Otro de los fármacos comúnmente usados son amoxicilina y ampicilina, los cuales presentan tasas de resistencia para *E.coli* del 40%. Sin embargo, su asociación con inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico o sulbactam) ha logrado que la resistencia a estos antibióticos sea del 5-10%, por lo que son una opción útil en el tratamiento de la ITU incluso en las cepas productoras de beta lactamasas de espectro

extendido (BLEE). No obstante, en un régimen posológico de tres días, la eficacia de amoxicilina/ácido clavulánico en el tratamiento de una cistitis aguda no complicada es menor que ciprofloxacino (Hooton et al., 2005). Estos resultados coinciden con el de otros estudios, que demuestran que las tasas de erradicación son menores en comparación con cotrimoxazol y quinolonas (Hooton et al., 1995; Sigurdsson et al., 1983).

Otro antibiótico ampliamente usado en el tratamiento de la ITU es la fosfomicina. Se trata de un derivado del ácido fosfónico que bloquea la síntesis de precursores del peptidoglicano de la pared bacteriana. Es un antibiótico activo frente a Gram positivos y Gram negativos. La sal de trometamol le confiere una mayor estabilidad a PH gástrico y su absorción vía oral aumenta a un 50-60%. Además se excreta de forma activa vía renal, alcanzando elevadas concentraciones en la vejiga urinaria. Sus propiedades farmacocinéticas, le permiten conseguir niveles urinarios óptimos en 48-72 horas con una sola dosis de 3 gramos. Por el contrario, los niveles séricos y renales de fosfomicina administrada por vía oral son muy bajos, no siendo útil en casos de pielonefritis, prostatitis o sepsis.

Algunos estudios demuestran como las tasas de erradicación de fosfomicina son ligeramente inferiores a las observadas con un tratamiento de 5-7 días con quinolonas, pero similares a 7 días con nitrofurantoína. En lo que respecta a las tasas de recurrencia, fosfomicina presenta unos resultados similares a quinolonas y cotrimoxazol (Jardin A., 1990; Boerema et al., 1990; De Jong et al., 1991). Con estos datos y teniendo en cuenta que las tasas de resistencia a este antibiótico en nuestro medio son inferiores al 4% (Andreu et al., 2008), y que las resistencias a cotrimoxazol y quinolonas están en aumento, fosfomicina puede considerarse un tratamiento de primera línea terapéutica de la cistitis aguda no complicada (Pigrau et al., 2002).

En la siguiente tabla se resumen los datos de eficacia clínica y microbiológica inicial de los distintos agentes recomendados para el tratamiento de la cistitis aguda no complicada.

Antibiótico	Eficacia clínica (%)	Eficacia microbiológica (%)
Fosfomicina trometamol (3 g. en monodosis)	91	80 (78 - 83)
Cotrimoxazol (800 mg/12 h, 3 días)	93 (90 - 100)	94 (91 - 100)
Fluorquinolonas (varios regímenes, 3 días)	90 (85 - 98)	91 (81 - 98)
Betalactámicos (varios regímenes, 3-5 días)	89 (79 - 98)	82 (74 - 98)

Tabla 1. Datos de eficacia clínica y microbiológica inicial de los distintos agentes recomendados para el tratamiento de la cistitis aguda no complicada. Tomado de: J.P. Horcajada, L. Sorlí, M. Montero. Tratamiento de las infecciones no complicadas del tracto urinario inferior. En: Pigrau C. Editor. Infección del tracto urinario. Editorial Salvat. 2013. p. 57-72.

1.5.- IMPORTANCIA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico ha alcanzado un alto nivel de protagonismo en base a dos importantes funciones. La primera de carácter clínico, mediante el manejo de los síndromes infecciosos, y la segunda de tipo epidemiológico, ya que el aislamiento de un microorganismo en una muestra clínica puede conducir al hallazgo de la fuente y de su vía de transmisión, permitiendo al personal sanitario frenar la diseminación de microorganismos de especial vigilancia (Stratton et al., 2004). Además, el laboratorio de Microbiología interpreta y traduce la información de su área de competencia para el personal clínico y los profesionales de prevención y control de infecciones, teniendo un

papel fundamental en el entrenamiento de los mismos, lo cual repercute positivamente en el desarrollo conjunto de nuevas estrategias que permitirán salvaguardar la eficacia de los tratamientos antibióticos (Poutanen et al., 2003).

Cierto es, que algunas infecciones son diagnosticadas clínicamente y tratadas empíricamente (meningitis o sepsis), sin el aislamiento previo del microorganismo causante de la infección o sin la información del antibiograma. Sin embargo, si la sospecha de infección es firme, el diagnóstico puede ser confirmado mediante las pruebas realizadas en el laboratorio de Microbiología, permitiendo instaurar un tratamiento dirigido más efectivo. Esto supone mejores resultados para el paciente en cuanto a la evolución del proceso infeccioso y aporta grandes ventajas respecto al control epidemiológico de la infección y las resistencias bacterianas (Stratton et al., 2004).

Por otro lado, el laboratorio de Microbiología juega un papel fundamental en la docencia del personal sanitario, ya que obtener una buena información microbiológica, depende en gran medida de todos los procesos que se suceden desde la correcta obtención, conservación y procesamiento de la muestra clínica, hasta la emisión del resultado (Poutanen et al., 2003; Stratton et al., 2004). De ahí la importancia del laboratorio de Microbiología de instruir al personal sanitario para garantizar la eficiencia del diagnóstico microbiológico.

El diagnóstico microbiológico juega un papel muy importante en el control de las infecciones relacionadas con la atención sanitaria (IRAS), ya que tiene una participación activa en el manejo de brotes, tipificación de bacterias, hongos y vigilancia de nuevos microorganismos o resistencias inusuales (Stratton et al., 2004). En algunos países, es el propio laboratorio de Microbiología el que tiene la obligación de informar a los departamentos de Salud Pública sobre alertas de interés socio-sanitario (Poutanen et al., 2003).

Además, el Microbiólogo puede entrenar tanto al personal clínico como al personal de control de infecciones acerca de los microorganismos de mayor relevancia clínica y epidemiológica, jugando un papel vital en la comunicación entre los distintos profesionales que conforman un equipo multidisciplinar de control de infecciones (Poutanen et al., 2003; Stratton et al., 2004). En algunas ocasiones, el equipo de control de infecciones requiere de información adicional para aclarar situaciones endémicas o epidémicas mediante la solicitud de muestras ambientales. En este aspecto el laboratorio de Microbiología vuelve a adquirir un papel relevante para el aislamiento e

identificación de microorganismos desencadenantes de brotes nosocomiales. De hecho, es el laboratorio de Microbiología quien debe emitir informes periódicos de los aislamientos bacterianos al equipo de control de infecciones. Estos informes pueden resultar muy útiles en la planificación de medidas preventivas (Poutanen et al., 2003; Stratton et al., 2004).

El aislamiento de los principales microorganismos de especial vigilancia, permite al equipo de control de infecciones tomar las medidas preventivas oportunas para evitar la diseminación de los mismos. Esto justifica la necesidad del equipo de control de infecciones de colaborar de forma conjunta con el laboratorio de Microbiología con el fin de identificar los principales microorganismos de alerta por su elevada multiresistencia y patogenicidad (*S.aureus* resistente a meticilina, Enterobacterias productoras de carbapenemasa y BLEE, *E.faecalis* resistente a vancomicina, *P.aeruginosa* multiresistente, *A.baumannii* multiresistente o *C.difficile*). La vigilancia activa de estos microorganismos supone uno de los mayores esfuerzos que debe realizar un centro sanitario. Paralelamente, el laboratorio de Microbiología puede informar acerca del vínculo entre estas infecciones (Poutanen et al., 2003; Stratton et al., 2004).

Asimismo, es labor del laboratorio de Microbiología determinar el perfil de resistencia antibiótica de los microorganismos causantes de IRAS. Se trata de una labor importante no sólo desde el punto de vista epidemiológico sino también en cuanto a la política antibiótica. Además, se encarga de elaborar boletines de información microbiológica y de consumo de antibióticos (BIMCA) que recogen los patrones locales de resistencia por microorganismo y antibiótico, proporcionando así una útil herramienta al clínico a la hora de pautar el tratamiento empírico más adecuado (Poutanen et al., 2003; Stratton et al., 2004).

El diagnóstico microbiológico está teniendo un papel cada vez más importante en la Medicina Clínica y en la prevención de las IRAS, y más aún si cabe ante la creciente prevalencia de microorganismos multiresistentes. Por ello, ha centrado parte de sus esfuerzos en potenciar el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas que permitan mejorar la atención del paciente y la salud pública al reducir la progresión y diseminación de la enfermedad y optimizar el tratamiento (Stratton et al., 2004).

1.6.- PROBLEMÁTICA EN PAÍSES NO INDUSTRIALIZADOS

1.6.1.- Diagnóstico microbiológico

El principal inconveniente del diagnóstico microbiológico en países en vías de desarrollo es la escasez de recursos económicos y materiales. Por lo tanto, es muy importante disponer de pruebas microbiológicas que se puedan realizar en el punto de atención del paciente, que tengan elevada especificidad, rapidez, fáciles de utilizar por personal no cualificado, inequívocas en su interpretación y accesibles desde el punto de vista económico. Algunas pruebas con este perfil ya se encuentran en uso, como por ejemplo, pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria o VIH. No obstante, es necesario ampliar la oferta de estos dispositivos con el fin de cubrir el diagnóstico del mayor número de síndromes infecciosos posibles.

En esta línea, otro problema con el que se encuentran los países no industrializados, es la poca garantía de que dichas pruebas de laboratorio generen resultados fiables, entre otras causas por la ausencia de procedimientos de laboratorio debidamente estandarizados que condicionan la actuación profesional, y la escasez de recursos económicos.

Una de las principales tareas de un laboratorio de Microbiología consiste en proporcionar información con la cual los médicos puedan diagnosticar y tratar las enfermedades infecciosas. Para ello, se requiere de un mínimo de recursos que garanticen la calidad del informe microbiológico. La adecuada interrelación entre el microbiólogo y el médico determina a última instancia el éxito del informe final (Koneman et al., 1992).

En la mayoría de países en vías de desarrollo, el diagnóstico microbiológico de las infecciones se enfrenta a una serie de problemas añadidos que podrían resumirse en los siguientes puntos:

- Informes clínicos incompletos que no permiten valorar de forma real la etiología del proceso infeccioso ni la estrategia terapéutica a seguir en el paciente.

- Limitación de recursos básicos como la escasez de medios de cultivo, reactivos y material de laboratorio.
- Demora en la emisión de los informes microbiológicos.
- Falta de personal cualificado para la interpretación y validación de pruebas de laboratorio.

Estas dificultades obligan al médico a tomar decisiones terapéuticas no siempre acertadas, contribuyendo de forma notable al incremento de las resistencias bacterianas y al consumo excesivo de antibióticos, por la no confirmación mediante técnicas microbiológicas, del 50% de las infecciones (Wolff M., 1993).

Obviamente, la falta de recursos económicos constituye una de las principales causas de estos problemas. No obstante, algunos trabajos demuestran que un diagnóstico deficiente, a pesar de no ser un fenómeno exclusivo de países subdesarrollados, condiciona también el resultado final del informe microbiológico (Archibald et al., 2001; Siqueira J.E., 2002). No obstante, otros trabajos destacan la importancia de un eficiente diagnóstico microbiológico para optimizar el diagnóstico clínico y pautar de forma correcta el tratamiento terapéutico (González et al., 2001).

En definitiva, la calidad de un servicio sanitario está determinada por un alto nivel de excelencia profesional y un uso eficiente de los recursos materiales disponibles (Jimenez R., 2004; Ramos B.N., 2004).

1.6.2.- Infección urinaria y resistencias antibióticas

Las infecciones urinarias asociadas a la asistencia sanitaria, representan el grupo más grande entre todas las infecciones asociadas a la atención médica, siendo mayor en los países subdesarrollados, que en los países desarrollados. Mientras que en EE.UU y Europa la prevalencia es del 13% y 20% respectivamente, en los países en vías de desarrollo es del 24% (Allegranzi et al., 2011; Tandogdu et al., 2016).

Asimismo, debido al uso aberrante e indiscriminado de antibióticos en los países de economía más precaria, los microorganismos resistentes a múltiples fármacos, y los uropatógenos productores de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) están aumentando de forma considerable, dificultando la terapia antiinfecciosa de esta patología (Yolbas et al., 2013; Leylabadlo et al., 2017).

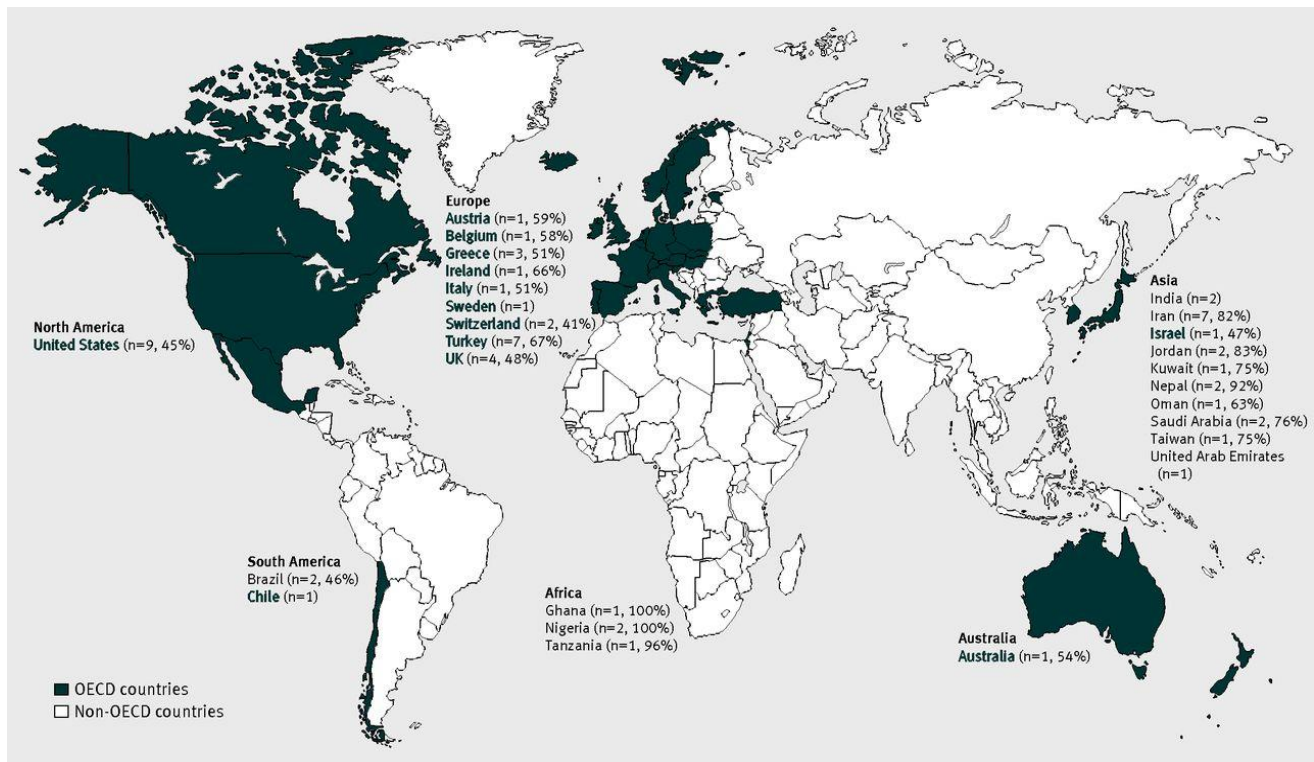


Figura 1. Distribución geográfica de la prevalencia de resistencia a ampicilina (%) de *E.coli* uropatógeno en países desarrollados (OECD) y subdesarrollados (Non-OECD). Número de estudios incluidos por país entre paréntesis.

En algunos países como Egipto, el análisis de los aislamientos de *E.coli* mostró que el 72% presentaban un perfil de multiresistencia, y la prevalencia de BLEE era del 89%. En países como Irán, el 43% de los aislamientos en muestras de orina son productores de BLEE. Mientras que en Iraq, la mayoría de *K.pneumoniae* eran productoras de carbapenemasas (Shiralizadeh et al., 2018). Dichas cifras coinciden con otros países africanos como Etiopía, donde el 92% de los aislamientos presentaban resistencia al menos, a dos antibióticos (Getachew et al., 2013). Finalmente, destacar la elevada resistencia para la mayoría de antibióticos de primera línea en el tratamiento de la ITU en América Latina (Soraya et al., 2006).

Por otro lado, la prevalencia de bacteriuria asintomática en mujeres embarazadas en algunos países en vías de desarrollo puede llegar a ser del 40% según diversos estudios, mientras que, en los países de mayor poder adquisitivo, oscila alrededor del 7% (Ajayi et al., 2012; Nicolle et al., 2005).

Actualmente, la infección urinaria es uno de los principales problemas a los que se enfrentan los países no industrializados. Las altas tasas de resistencia a los antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de la ITU, así como, la alta incidencia de dicha

infección en la población de estos países, fomentan la necesidad de desarrollar dispositivos médicos para detectar y monitorizar las resistencias antibióticas.

1.7.- NECESIDAD DEL DIAGNÓSTICO RÁPIDO EN MICROBIOLOGÍA

Los métodos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas deben de ser rápidos, precisos, sencillos y asequibles económicamente. Un diagnóstico precoz adquiere una importancia crucial en la curación del paciente, ya que permite instaurar un tratamiento dirigido de inmediato. Un aspecto que condiciona la necesidad de disponer de técnicas de diagnóstico rápido es el incremento de los microorganismos multirresistentes, lo cual ocasiona una mayor probabilidad de error en el tratamiento antibiótico empírico. En la actualidad, los laboratorios de microbiología están asistiendo a un importante progreso en el que se incluyen importantes avances tecnológicos como la biología molecular, microbiología digital y las técnicas de espectrometría de masas. Diversos estudios demuestran que estos cambios en el diagnóstico microbiológico reducen el tiempo de respuesta y consecuentemente el impacto clínico en el paciente (Vila et al., 2017).

Considerando todas las especialidades, la microbiología clínica, y más concretamente el diagnóstico microbiológico, es el paradigma de medicina personalizada.

1.7.1.- Sepsis

Evidentemente, un retraso en la instauración del tratamiento antibiótico adecuado durante un cuadro de sepsis, aumenta el riesgo de mortalidad (Kumar et al., 2006). Hasta la llegada de la biología molecular, el hemocultivo era, y continúa siendo el método estándar para la detección rutinaria de bacterias y hongos en sangre. No obstante, el hemocultivo tiene el contratiempo de una demora importante en la obtención de resultados. La implementación del MALDI-TOF directo del hemocultivo positivo junto con la detección de genes codificantes de resistencia, han generado un importante impacto clínico y económico reduciendo el tiempo de instauración del tratamiento dirigido (Pérez et al., 2013; Wolk et al., 2009; Zboromyrska et al., 2015; Kothari et al., 2014).

Generalmente, la sepsis es tratada empíricamente utilizando tratamientos de amplio espectro. No obstante, el incremento de las resistencias bacterianas a nivel mundial origina en muchas ocasiones fracaso terapéutico. Los estudios han demostrado que cada hora de retraso en la implementación de un tratamiento eficaz en pacientes con sepsis se incrementa la mortalidad en un 8% (Kumar et al., 2006). Por otro lado, las técnicas de biología molecular que detectan genes específicos de resistencia en sangre obtienen resultados más rápidos que el hemocultivo pues evitan la fase de crecimiento bacteriano. No obstante, estas técnicas también presentan limitaciones como los riesgos de contaminación, la presencia de DNA “de fondo” en sangre y la carencia de un *gold standard* ideal (Kothari et al., 2014). Por ello, estas técnicas tienden a considerarse un complemento de los hemocultivos convencionales más que un método definitivo (Lehmann et al., 2009).

Por tanto, el cultivo de sangre sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico de sepsis, ya que es necesario para la determinación de la susceptibilidad antibiótica. La mayor necesidad de cara al futuro en el diagnóstico de la sepsis es identificar el agente causal y su perfil de susceptibilidad antibiótica directamente de sangre. Una prueba idónea debería ser capaz de trabajar con un pequeño volumen de sangre, ser rápida, sencilla, automatizada y de bajo costo. Otra ventaja adicional, sería la posibilidad de poder determinar la carga bacteriana directamente de la sangre. Diversos estudios publicados demuestran que la determinación de la carga bacteriana mediante PCR cuantitativa (qPCR) constituye una potencial herramienta para la evaluación de la eficacia al tratamiento y al pronóstico de pacientes con infecciones bacterianas agudas (Rello et al., 2009).

1.7.2.- Infecciones respiratorias

El diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias se fundamenta principalmente en la gran variedad de tinciones existentes. Además, estas técnicas permiten valorar la celularidad y calidad de la muestra, así como, distinguir la presencia de microorganismos potencialmente patógenos. Posteriormente, se añadieron a las tinciones convencionales, la inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de infecciones causadas por *Legionella pneumophila* e infecciones víricas. La llegada de las técnicas inmunocromatográficas proporcionó otra eficiente herramienta en el

diagnóstico rápido de infecciones causadas por microorganismo como *S.pneumoniae* y *L.pneumophila* en orina, virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus y virus de la gripe.

Aun así, en el caso de la neumonía adquirida en la comunidad, cerca de un 50% de las mismas carecen de diagnóstico etiológico definitivo, y se admite que aproximadamente otro 50% de las causas microbianas conocidas son por *S. pneumoniae*.

El desarrollo de las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) permite disponer ahora de técnicas moleculares que se pueden realizar directamente de la muestra e incluyen la posibilidad de determinar más de un patógeno respiratorio, como es el caso de las técnicas de PCR múltiples disponibles.

La incorporación de técnicas rápidas de diagnóstico microbiológico se traduce en un beneficio para el paciente con síndrome infeccioso respiratorio, ya que permiten instaurar un tratamiento precoz y dirigido, así como, tomar medidas de aislamiento y de salud pública si fuesen necesarias.

No obstante, la no realización del cultivo implica perder toda la información proporcionada por el mismo, como es la sensibilidad antibiótica.

1.7.3.- Meningitis y encefalitis

El diagnóstico clínico y microbiológico rápido, junto a un tratamiento precoz y eficaz, son aspectos claves para minimizar la morbimortalidad de las infecciones del sistema nervioso central (SNC), especialmente de las meningitis y encefalitis de origen infeccioso, cuyas complicaciones pueden ser muy graves y las secuelas devastadoras, pese a la supervivencia (Brouwer et al., 2010; Edmond et al., 2010). Además, los costes asociados a estas infecciones son significativos tanto a corto plazo, en relación con la hospitalización y tratamiento, como a largo plazo por la pérdida de contribución al medio social y laboral (Portnoy et al., 2015). En la diferencia para el diagnóstico clínico, citobioquímico y microbiológico de las meningitis y encefalitis, el líquido cefalorraquídeo (LCR) constituye una muestra de valor incuestionable. Las pruebas esenciales en el estudio del LCR suelen incluir las tinciones rápidas (Gram, Ziehl-Neelsen, tinta china, etc.), la detección de antígenos bacterianos, los distintos tipos de cultivos (bacterias, micobacterias y hongos) y, cada vez más, la implementación de

métodos moleculares. Todo ello emparejado con el análisis celular y estudio bioquímico de una serie de parámetros de laboratorio.

Las sospechas de meningitis con una tinción de Gram del LCR negativa representan un desafío diagnóstico y terapéutico importante, puesto que en la mayoría de los casos, los microorganismos causantes serán desconocidos. En ocasiones, una prueba rápida de aglutinación de antígenos puede utilizarse en el diagnóstico, y esta opción cubre una amplia gama de microorganismos bacterianos, pero es poco sensible. A causa de los resultados falsos positivos que también se han comunicado con este método, algunas instituciones lo han abandonado (El Bashir et al., 2003).

En el caso de la meningitis bacteriana, el cultivo es de utilidad, pero puede necesitar de 2-5 días, y podría ser falsamente negativo si el microorganismo es nutricionalmente exigente, hubo tratamiento antibiótico previo o la manipulación de la muestra fue incorrecta, rindiendo un resultado estéril o no creciendo el microorganismo en cultivos convencionales. Por todo ello, es posible que el advenimiento de las modernas TAAN permita solucionar, o compensar, parte de estas limitaciones de la microbiología tradicional en el procesamiento, trabajo, rendimiento y resultados de las muestras. Las TAAN pueden ser de ayuda en el diagnóstico y en la monitorización y resolución de la meningitis bacteriana (Tunkel AR., 2016). No obstante, la PCR no debe obviar, por ahora, la práctica de cultivos microbiológicos, que siguen siendo necesarios además para determinar la sensibilidad de los aislados a los antibióticos y monitorizar la resistencia en un contexto epidemiológico y geográfico concreto.

1.7.4.- Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) han presentado un considerable incremento en su incidencia en los últimos años.

El diagnóstico microbiológico rápido de estas infecciones persigue un doble objetivo. Por un lado, instaurar un tratamiento efectivo que evite el avance de la enfermedad y sus posibles secuelas. Y por otro, establecer las medidas preventivas encaminadas a evitar la diseminación de la infección. La rapidez en el diagnóstico es esencial para conseguir ambos objetivos debido a la peculiaridad de estas infecciones, que a menudo provocan en los pacientes que las padecen, conductas de ocultación, y resistencia a acudir a los centros sanitarios.

La existencia de consultas de ITS que ofrezcan al paciente, además de discreción, un diagnóstico clínico y microbiológico rápido, contribuye sin lugar a dudas a frenar su expansión. En este contexto, el diagnóstico microbiológico rápido debe ir encaminado a establecer la existencia o no de infección, así como, a descubrir cuál es el agente etiológico de la misma. Clásicamente, el microbiólogo ha dispuesto de diversas técnicas rápidas basadas en el examen microscópico que siguen manteniendo su eficacia, como la tinción de Gram del exudado uretral (para la uretritis gonocócica), el examen en fresco del exudado vaginal (para la vaginitis por *Trichomonas vaginalis*) o la microscopía en campo oscuro para la sífilis primaria (aunque con sus limitaciones de índole práctico).

Existen actualmente algunas plataformas de rt-PCR múltiple que permiten la detección de algunos de estos microorganismos en menos de una hora (Gaydos et al., 2010). Otras, permiten la detección de siete o más patógenos genitales (Samra et al., 2011) aunque requieren para ello un tiempo mayor. La adecuada combinación de los microorganismos capaces de ser detectados para una determinada ITS, una excelente sensibilidad y especificidad, un aumento en la rapidez de la técnica y en la facilidad en llevarla a cabo, además de su decreciente coste económico, facilitarán el empleo de estas TAAN múltiples como método de diagnóstico rápido de las ITS.

1.7.5.- Infección urinaria

Las infecciones urinarias comprenden hasta el 36% de las infecciones nosocomiales (Klevens et al., 2007), y hasta un 30% de los casos de sepsis, tienen su origen en el tracto urinario (Levy et al., 2012). La urosepsis puede provocar un shock séptico, y su tasa de mortalidad es del 5% (Foxman B., 2014). Asimismo, de los pacientes que desarrollan una pielonefritis aguda, solo el 30% muestran hemocultivos positivos (Sandberg et al., 2012) y, por lo tanto, el diagnóstico definitivo se basa en el cultivo de orina.

No obstante, el cultivo bacteriológico presenta una demora de 24 horas, y los resultados de las pruebas de sensibilidad antibiótica no están disponibles antes de 48 horas.

Por ello, se han desarrollado diversos métodos de diagnóstico rápido para la identificación de patógenos en muestras de orina (Ferreira et al., 2010, 2011; Köhling et al., 2012; Burillo et al., 2014; Kim et al., 2015; Veron et al., 2015; Íñigo et al., 2016).

Sin embargo, todos estos métodos incluyen un laborioso procesamiento previo de la muestra, lo que dificulta su implantación en la rutina diaria del laboratorio.

Por otro lado, el estudio de Sundqvist et al., 2015 obtiene buenos resultados en cuanto a la determinación del perfil de resistencia de enterobacterias a partir de muestras de orina directa mediante la técnica difusión disco-placa.

La combinación de estas técnicas, permitiría mejorar de forma significativa el diagnóstico y manejo de la ITU, reduciendo la morbimortalidad de los pacientes, especialmente en aquellos que presentan mayor riesgo de sufrir una sepsis de origen urinario, como por ejemplo, los ancianos, inmunodeprimidos y embarazadas (Johanna et al., 2016).

1.8.- ANTIBIOGRAMA EN MICROBIOLOGÍA

1.8.1.- Métodos convencionales: ventajas e inconvenientes

Una de las principales funciones de un laboratorio de Microbiología es definir una metodología que permita identificar los microorganismos implicados en un proceso infeccioso y determinar su perfil de susceptibilidad antibiótica. Para ello, los laboratorios de Microbiología utilizan métodos convencionales y no convencionales que permiten lograr los objetivos mencionados.

Entre los métodos convencionales utilizados en la rutina diaria por parte de un laboratorio de Microbiología encontramos: tinciones, microscopía óptica, medios de cultivo, métodos fenotípicos (oxidasa, catalasa...), pruebas bioquímicas (ureasa, citrato, indol...), antibiograma por técnicas de difusión disco-placa, tiras épsilon-test o microdilución en caldo.

La microbiología convencional depende principalmente del cultivo y de las pruebas bioquímicas. La tendencia actual es desarrollar técnicas que permitan obtener un diagnóstico rápido y preciso de manera que los pacientes puedan ser tratados rápidamente. La implementación de la tecnología en el laboratorio de Microbiología está en auge, sin embargo, parte de la microbiología convencional continúa siendo el método de referencia.

Dentro de los métodos convencionales, los sistemas automatizados que determinan la susceptibilidad antibiótica mediante microdilución, permiten disminuir los tiempos de

respuesta ya que mejoran la sensibilidad del método analítico, al fundamentarse en fenómenos como la colorimetría, turbidimetría o la fluorimetría.

No obstante, estas técnicas presentan algunas restricciones para su uso debido a las exigencias nutricionales de algunos microorganismos y las propiedades físicas de determinados antimicrobianos. Por ello, es necesario recurrir en estas ocasiones a las técnicas de difusión disco-placa, ya que se ajustan mejor a los requerimientos nutricionales de los microorganismos.

Otra ventaja de los sistemas automatizados por microdilución es el impacto clínico, ya que proporcionan información tan valiosa como la concentración mínima inhibitoria (CMI), además de reducir el tiempo del informe de resultados, lo que permite un inicio o cambio precoz del tratamiento antimicrobiano que está recibiendo el paciente. Sin embargo, su alto coste limita en muchas ocasiones su implantación en un laboratorio de Microbiología. Las técnicas de difusión disco-placa o las tiras épsilon-test son más económicas.

Los sistemas automatizados permiten aumentar la reproducibilidad intra- e interlaboratorio, disminuir la carga de trabajo al requerir menos personal y disminuir los errores post-analíticos. A pesar de ello, necesita de un equipo o metodología manual de respaldo. Otro inconveniente de los sistemas automatizados es la poca flexibilidad que permiten con algunos de los antimicrobianos ensayados, lo cual, refuerza la necesidad de complementar el estudio de susceptibilidad antibiótica con técnicas manuales de antibiograma.

En resumen, los métodos convencionales presentan una buena sensibilidad, son de fácil interpretación y presentan un bajo coste. No obstante, entre sus inconvenientes destaca el uso de grandes volúmenes de medios de cultivo, la demora en la obtención y análisis de resultados y la laboriosidad del montaje de la técnica.

1.8.2.- Métodos rápidos

En muchas ocasiones las enfermedades infecciosas deben de ser tratadas empíricamente hasta la obtención de los resultados de identificación y susceptibilidad antibiótica. Este proceso, en la rutina diaria de un laboratorio de Microbiología puede tardar entre 48-72 horas. Con el fin de reducir los tiempos de respuesta del laboratorio, y optimizar el diagnóstico microbiológico, se empiezan a desarrollar técnicas cada vez más rápidas e

innovadoras que permitirán reducir el tiempo de emisión de los informes microbiológicos, y en consecuencia, pautar desde el inicio un tratamiento dirigido que favorezca la evolución clínica del paciente (Doern et al., 1994; Barenfanger et al., 1999; Kumar et al., 2006; Lueangarun et al., 2012; Pérez et al., 2014; Kerremans et al., 2008). A la hora de evaluar estas innovadoras técnicas, es importante tener en cuenta el tipo de infección y la metodología utilizada para reducir el tiempo de respuesta microbiológica (técnicas sobre muestra clínica directa o cultivos positivos). Además, hay que valorar los horarios del laboratorio, las vías de respuesta para el clínico, posibilidad de consulta con especialistas en enfermedades infecciosas etc. Todos estos factores condicionan la comparación entre los distintos estudios. No obstante, todos coinciden en que la presentación de resultados de identificación y susceptibilidad antibiótica en el menor tiempo posible, no solo mejora la evolución clínica del paciente sino que reduce los costes socio-sanitarios. Por último, hay que mencionar que la no instauración de un tratamiento dirigido conlleva en muchas ocasiones un mal uso del antibiótico, y en consecuencia, un incremento de las resistencias bacterianas en el ambiente hospitalario (Canton et al., 2013).

Como comentamos anteriormente, el diagnóstico microbiológico basado en el aislamiento en medios de cultivo y posterior identificación y antibiograma suele ser lento y laborioso. Esta demora en la obtención de resultados, así como la imposibilidad en muchas ocasiones de aislar los microorganismos fastidiosos, ha obligado a desarrollar técnicas moleculares para un diagnóstico precoz (Liesenfeld et al., 2014; Picard et al., 2002; Van Belkum et al., 2013; Van Belkum et al., 2015). Las técnicas rápidas van camino de adquirir un papel importante en el tratamiento empírico, por ello, es necesario que tengan la capacidad de determinar tanto la identidad del microorganismo como sus patrones de resistencia natural y adquirido. De esta idea surge el concepto de “*Theranostics*”, que destaca la importancia de que las técnicas de diagnóstico rápido puedan identificar tanto el microorganismo como su perfil de resistencia antibiótica para iniciar el tratamiento adecuado (Picard et al., 2002). Muchas empresas trabajan de forma activa en este campo (Liesenfeld et al., 2014; Van Belkum et al., 2013; Van Belkum et al., 2015).

Lo ideal sería conocer la identificación del microorganismo y su resistencia a partir de muestra clínica directa. En el mercado existen kits comerciales validados por la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA) o la Conformidad Europea (CE) con esta finalidad. La mayoría de estos kits se fundamentan en la

detección de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) aplicada al diagnóstico de infecciones específicas (ej. Sepsis) (Liesenfeld et al., 2014; Bissonnette et al., 2010). Estas técnicas de diagnóstico rápido han sido supervisadas por la fuerza Transatlántica sobre la resistencia a los antimicrobianos (TATFAR) con miembros de la Unión Europea y los Estados Unidos de América (Commission's C., 2011).

A pesar de su enorme potencial, estos sistemas también presentan ciertas limitaciones como: volumen de muestra necesario, nivel de sensibilidad clínica y un restringido número de microorganismo a estudiar (Liesenfeld et al., 2014; Van Belkum et al., 2013; Carrara et al., 2013). Además, los escasos kits comerciales disponibles para la detección de genes codificadores de resistencia antibiótica, sólo pueden analizar un pequeño número de estos genes (Liesenfeld et al., 2014; Van Belkum et al., 2013; Carrara et al., 2013). No obstante, estas dianas suelen presentar una gran relevancia clínica y epidemiológica ya que son los responsables de codificar carbapenemasas, beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) o resistencia a vancomicina y meticilina.

En la resistencia a los antibióticos por parte de algunos microorganismos, están involucrados varios genes. Algunos de ellos fácilmente detectables (ej. beta-lactamasas) y otros requieren la detección de múltiples dianas. En muchas ocasiones la detección del gen está condicionada por su grado de expresión y por las mutaciones que integra. Por ejemplo, en los bacilos Gram negativos están involucrados múltiples genes que confieren resistencia a los antibióticos de la familia de los beta-lactámicos y aminoglucósidos, y numerosas mutaciones afectan a fluorquinolonas, aminoglucósidos y macrólidos, por lo que su detección por técnicas moleculares supone un gran reto (Rice et al., 2011). Una alternativa para solventar estas limitaciones es la secuenciación masiva que junto con el software de interpretación de datos puede caracterizar los genes de resistencia de los microorganismos. No obstante, su elevado coste y complejidad dificulta su implantación en la rutina diaria de un laboratorio de Microbiología.

Un gran número de laboratorios tienen a su disposición técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. No obstante, las pruebas de susceptibilidad antibiótica se basan fundamentalmente en las técnicas tradicionales como: microdilución en caldo, difusión de discos en agar o E-test (Jorgensen et al., 2009). Estas técnicas requieren previamente del crecimiento del microorganismo en los medios de cultivo, por lo que se demora la obtención del antibiograma 18-24 horas. El objetivo

de los kits comerciales es reducir este tiempo a 4-6 horas (Van Belkum et al., 2013; Van Belkum et al., 2015).

En los últimos años, se han buscado variantes que puedan acelerar la obtención de resultados de antibiograma como: aplicación de tecnologías de microfluidos, microcalorímetros, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, detección de microsonidos, Raman y espectroscopia de infrarrojos, detección intrínseca de fluorescencia, citometría de flujo, sensibilidad a bacteriófagos, métodos de impedancia mediada por apoptosis marca-ERS o vectores de expresión de luciferasa (Van Belkum et al., 2013; Van Belkum et al., 2015; Pulido et al., 2013; March et al., 2016). La mayoría de estas técnicas han sido validadas antes de que puedan sustituir a los sistemas tradicionales. No obstante, antes de implementar un nuevo procedimiento en la rutina de trabajo de un laboratorio de Microbiología se debe valorar su capacidad de automatización.

Muchos procedimientos alternativos han sido publicados para determinar la susceptibilidad de microorganismos a los antibióticos, ya sea de muestra directa o cultivo. No obstante, hay limitaciones que resolver.

El desarrollo de las técnicas moleculares para la detección de genes de resistencia son difíciles de desarrollar debido a las múltiples dianas existentes, numerosas familias de antimicrobianos, falta de conocimiento de los mecanismos de resistencia moleculares y el papel que desempeñan los genes reguladores de la expresión que pueden alterar la sensibilidad antimicrobiana de las bacterias.

Por otro lado, aquellas técnicas que dependen del crecimiento del microorganismo en los medios de cultivo y que permiten obtener resultados de susceptibilidad antibiótica en unas horas, requieren de mayor automatización y simplificación antes de ser introducidas en la rutina diaria de un laboratorio. Además, su sensibilidad, especificidad y costos deben de ser validados. Otros factores limitantes son: el horario del laboratorio, la disponibilidad de personal cualificado, la automatización del equipo comercial y la posibilidad de contactar inmediatamente con el clínico para instaurar el tratamiento adecuado.

Los progresos realizados en este sector deben continuar, ya que ayudarán a mejorar la atención del paciente, reducir los costes socio-sanitarios y prevenir el incremento de las resistencias bacterianas a los antimicrobianos.

Bioluminiscencia-ATP

Nuevos estudios (March et al., 2016) proponen una metodología basada en la medición del ATP por bioluminiscencia para determinar la susceptibilidad antibiótica de forma rápida (2 horas). Tras el proceso de incubación, se extrae y cuantifica el ATP mediante un luminómetro. La unidad de luz relativa (RLU) del pocillo control (libre de antimicrobiano) se compara con los obtenidos en aquellos pocillos que contienen agente antimicrobiano. A continuación, mediante curvas ROC, definen el punto de máxima sensibilidad y especificidad de corte para determinar la susceptibilidad o resistencia del microorganismo ensayado. La concordancia de la sensibilidad obtenida mediante bioluminiscencia y las técnicas comerciales de referencia (E-test, MicroScan y VITEK-2) fue del 100%. No obstante, una de las principales limitaciones de esta técnica, es el elevado coste de los reactivos. En contraposición, este sistema puede automatizarse con relativa facilidad, reduciendo los costes asociados a la contratación de personal técnico cualificado. La rápida obtención de resultados que permite la técnica constituye sin duda, una importante herramienta para combatir las infecciones graves que requieren de un tiempo de respuesta corto. Esta técnica combinada con el MALDI-TOF permite obtener la identificación y susceptibilidad antimicrobiana en unas pocas horas.

Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular permiten la detección de material genético, tanto ácido desoxirribonucleico (DNA) como ácido ribonucleico (RNA). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica que presenta un mayor valor diagnóstico, permitiendo detectar una gran cantidad de microorganismos infecciosos, genotipos virales o genes de resistencia bacteriana (Mendez-Alvárez et al., 2004). Esta técnica permite una amplificación exponencial del material genético permitiendo obtener un elevado número de copias de la secuencia de DNA a estudio, y en consecuencia, una elevación de la sensibilidad de la técnica (Prats G., 2005).

El conocimiento y aprendizaje de la genética bacteriana ha permitido desarrollar variantes de PCR con capacidad de detectar simultáneamente distintos genes codificadores de resistencia antibiótica en apenas unas pocas horas (Pulido et al., 2013). Otra ventaja adaptada a la PCR en tiempo real es monitorizar el crecimiento bacteriano

mediante la detección de genes de resistencia antibiótica, cuando las bacterias se han incubado en presencia del antibiótico a estudio (Bartels et al., 2009; Boyle-Vavra et al., 2010).

Otras técnicas están basadas en la detección de genes de resistencia a partir de frascos de hemocultivo donde se ha evidenciado crecimiento bacteriano. Para la detección de *S.aureus* resistentes a meticilina se puede utilizar el sistema GeneXpert MRSA/SA (Cepheid®) o el Staph ID/R Blood Culture Panel (Great Basin Diagnostics®). Estos sistemas obtienen resultados en una hora con unos porcentajes de sensibilidad y especificidad próximos al 100% (Parta et al., 2009; Spencer et al., 2009; Wolk et al., 2009). En la detección de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras, el sistema FilmArray Blood Culture Identification panel (BioFire Diagnostics®) realiza una PCR múltiple que permite detectar, en una hora, 15 géneros bacterianos, 11 especies bacterianas y 5 especies de levaduras, y además los genes de resistencia mecA, vanA/B y blaKPC. La sensibilidad oscila entre un 83% - 100% y la especificidad es superior al 99%, dependiendo del patógeno estudiado (Blaschke et al., 2012).

Citometría de flujo

Por otro lado, la citometría de flujo es una técnica mediante la cual, las partículas (ej. células) pasan de forma lineal en flujo a través de un aparato con una intensidad de 500-4.000 partículas/s. De esta manera, se puede determinar de forma simultánea distintas propiedades celulares y caracterizar dichas subpoblaciones (Parks et al., 1984). A principio de los años ochenta se publican los primeros estudios acerca de la importancia de la citometría de flujo fluorescente en la determinación de la susceptibilidad antibiótica de las bacterias (Martínez et al., 1982; Steen et al., 1982). Ramani et al., 2000 consiguen determinar la susceptibilidad de distintas levaduras a anfotericina B y fluconazol, tras un determinado tiempo de incubación de las mismas con dichos antifúngicos. El tiempo para la obtención de resultados por citometría de flujo es de aproximadamente 6 horas. Los resultados obtenidos, son comparables a los del método de macrodilución en caldo, considerado el método de referencia por el *CLSI*. Shrestha et al., 2011 consiguen determinar en un plazo de 4 horas la resistencia a meticilina de *S.aureus* mediante histogramas en los que se representa la luz dispersada en un ángulo de 90° (SSC) frente a la señal de fluorescencia. Broeren et al., 2013 calculan la CMI

mediante el citómetro de flujo Sysmex UF-1000i de los microorganismos: *E.coli*, *P.aeruginosa* y *S.aureus* frente a amoxicilina, gentamicina y piperacilina.

Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia es un proceso de relajación radiante que tiene lugar cuando en una reacción química se genera una especie excitada electrónicamente. En cambio, la bioluminiscencia es una forma de quimioluminiscencia que aparece como consecuencia de una reacción química que tiene lugar en los organismos vivos, como por ejemplo luciérnagas (insectos de la familia *Lampyridae*). En esta reacción química, la sustancia luminiscente luciferina se oxida, en presencia de adenosín trifosfato (ATP), por la acción catalítica de la enzima luciferasa. Este sistema natural bioluminiscente de las luciérnagas tiene muchas aplicaciones analíticas, ya que la enzima luciferasa presenta gran especificidad por determinados sustratos y la cantidad de luz producida es directamente proporcional a la cantidad de ATP que se genera en la reacción (Limb et al., 1993). Los trabajos realizados sobre la determinación de la susceptibilidad bacteriana y CMI mediante bioluminiscencia, se fundamentan en la medida de los niveles de ATP bacteriano en presencia o ausencia de antibiótico (Wheat et al., 1988; Wheat et al., 1989). Para determinar la susceptibilidad bacteriana se requieren unas 4 horas, obteniéndose unas CMI muy similares a las obtenidas a partir de una dilución en medio sólido (Wheat et al., 1988; Wheat et al., 1989; Barton AP., 1985). Por otro lado, Ivancic et al., 2008 realizan un antibiograma directo a partir de 85 muestras de orina mediante bioluminiscencia. Todas las muestras presentaban un crecimiento monomicrobiano. Se determina la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina, nitrofurantoína, cotrimoxazol y vancomicina. Para poder realizar el antibiograma primero es necesario eliminar el ATP presente en la orina que no sea de origen bacteriano y después realizar la extracción del ATP bacteriano intracelular. Para estudiar la sensibilidad es necesario comparar la señal de ATP procedente de una alícuota de orina con cultivo positivo sin antibiótico con la señal de ATP procedente de otra alícuota de la misma orina que ha estado incubada durante 2 horas con antibiótico. De esta manera se logra una concordancia del 91% con la CMI obtenida a partir de la colonia mediante dilución en caldo.

A diferencia de la bioluminiscencia, la quimioluminiscencia solo requiere la adición de menadiona al cultivo del microorganismo, pudiendo prescindir de la rotura celular. A finales de los ochenta, diversas publicaciones sugieren que la quimioluminiscencia podría ser una eficiente herramienta para estudiar la viabilidad de los microorganismos (Yamashoji et al., 1989; Campbell et al., 1985). Mediante esta técnica, y tras 4 horas de proceso, la correlación entre la CMI obtenida mediante quimioluminiscencia y la macro- o microdilución en caldo es del 88 - 100% (Manome et al., 2003; Nagasawa et al., 2004; Komatsu et al., 2009).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una herramienta que permite obtener en unos minutos la identificación de microorganismos tales como bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y hongos filamentosos. La denominación “MALDI” proviene de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, y “TOF” alude al analizador de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (time of flight) (Giebel et al., 2010). El sistema MALDI-TOF realiza la identificación rápida de microorganismos mediante el método de la “huella peptídica”. En este método, las proteínas del microorganismo a identificar son hidrolizadas en pequeños péptidos y se obtiene un espectro de masas del hidrolizado, que se conoce con el nombre de huella peptídica. Esta huella, es única para cada microorganismo, y se compara con una amplia base de datos para obtener la identificación definitiva (Demirev et al., 1999; Keys et al., 2004). En lo que al antibiograma rápido se refiere, el sistema MALDI-TOF permite predecir en unas horas si las bacterias poseen enzimas que degradan los antibióticos. Para ello, los microorganismos previamente aislados en las placas de cultivo deben ser incubados durante un tiempo determinado con el antibiótico. Posteriormente, con el análisis realizado mediante el sistema MALDI-TOF se observa, en caso de que el microorganismo tenga la enzima responsable de la degradación del antibiótico, la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y la aparición de nuevos picos que corresponden a los metabolitos resultantes de la rotura del mismo. Si la bacteria no hidroliza el antibiótico, se observa únicamente el pico correspondiente al antibiótico. Este proceso permite detectar diferentes enzimas responsables de la hidrólisis de los antibióticos beta-lactámicos tales como las carbapenemasas (Burckhardt et al., 2011;

Hrabak et al., 2011). Esta misma metodología también ha sido aplicada directamente a partir de frascos de hemocultivo crecidos preparados artificialmente con cepas previamente caracterizadas (Sparbier et al., 2012). Además, se ha observado que tanto las cepas meticilin sensibles de *S. aureus* como las meticilin resistentes proporcionan unos picos de identificación característicos, de manera, que comparándola con una base de datos se puede predecir la resistencia a meticilina. De la misma manera, el sistema MALDI-TOF también permite discriminar entre cepas de enterococos resistentes y sensibles a vancomicina (Griffin et al., 2012).

Métodos comerciales convencionales

Existen diferentes métodos comerciales para determinar la susceptibilidad antibiótica de los microorganismos aislados en muestras clínicas. Son los métodos que se emplean con mayor frecuencia en el laboratorio de Microbiología. Una de estas técnicas, son las tiras épsilon test (E-test), las cuales se fundamentan en la presencia de un gradiente decreciente de antibiótico que nos permite determinar la CMI. Dicha técnica se ha utilizado para la realización de un antibiograma rápido a partir de muestras respiratorias. Por otro lado, los métodos de microdilución en caldo permiten la identificación bacteriana y la obtención del antibiograma a partir del frasco de hemocultivo directo. La identificación bacteriana requiere de 3 horas, con pobres resultados en bacterias Gram positivas y aceptables en Gram negativas; sin embargo, para la obtención de resultados de antibiograma se precisan 14 horas, obteniendo buenos resultados tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas (Bruins et al., 2004; Chen et al., 2008; Funke et al., 2004; Gherardi et al., 2012; Ling et al., 2003; Lupetti et al., 2010; Quesada et al., 2010; Wimmer et al., 2012). Finalmente, las pruebas inmunocromatográficas también han sido utilizadas a partir del frasco de hemocultivo directo. El test BinaxNow PBP2a (Alere[®]), utilizado para la determinación de sensibilidad de *S. aureus* a meticilina, requiere unos 30 minutos y muestra una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100%.

Métodos colorimétricos

Las diferentes técnicas basadas en procedimientos colorimétricos requieren unas 6 horas aproximadamente para la obtención de resultados de sensibilidad antibiótica. La resazurina es un compuesto que, cuando se añade a un cultivo bacteriano en medio líquido, si el microorganismo es resistente, se reduce por la acción metabólica de la bacteria. En cambio, si la bacteria es sensible al antibiótico, se bloquea su metabolismo y consecuentemente no se puede reducir la resazurina permaneciendo en su forma oxidada. La forma reducida de resazurina es estable y de color azul, y fotométricamente distinguible de la forma oxidada, que es de color rojo. Por tanto, la viabilidad celular puede ser monitorizada mediante espectrofotometría, colorimetría o fluorimetría. Aprovechando las ventajas de este compuesto se han desarrollado técnicas para la determinación de la resistencia de *S.aureus* a meticilina y vancomicina (Coban AY., 2012; Coban et al., 2006). Asimismo ha permitido estudiar el carácter bactericida o bacteriostático de diferentes antibióticos frente *S. aureus* o la resistencia de los microorganismos Gram negativos a colistina (Lescat et al., 2019). Otro compuesto con fundamento similar a la resazurina es el Violeta de Tetrazolio. Se trata de un colorante amarillo pálido, soluble en agua, que es reducido tempranamente en las células viables por componentes de la cadena respiratoria a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), evidenciando crecimiento bacteriano. La medición de la actividad de la enzima bacteriana nitrato reductasa es otro método colorimétrico de gran utilidad para la determinación de la susceptibilidad antibiótica. Cuando se incuba la bacteria en presencia de iones NO_3 y antibiótico, si la bacteria es resistente al antibiótico se van a generar iones NO_2 que, con los reactivos de Gries, originan un compuesto de color rojo. Con este método se ha determinado también la sensibilidad de *S. aureus* a meticilina y vancomicina.

Nefelometría

La nefelometría es una técnica analítica basada en la dispersión de luz que se puede adaptar a la obtención de un antibiograma rápido. El sistema UroQuick o HBandLTM (Alifax[®]), diseñado para realizar un cribado de muestras de orina, detecta la presencia de microorganismos en un tubo que contiene medio de enriquecimiento. El crecimiento

bacteriano origina una desviación de la luz que se mide con distintos detectores. Las señales obtenidas son analizadas por un software que monitoriza las curvas de crecimiento. De este modo, este sistema es capaz de informar la concentración microbiana de la muestra (Ilki et al., 2010). Aprovechando el fundamento de esta técnica, se ha conseguido detectar mecanismos de resistencia de cepas caracterizadas tanto genotípicamente como fenotípicamente. El tiempo para la obtención de resultados varía entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Se requieren 24 horas en el caso de Gram positivos y 8 horas en el caso de Gram negativos (Roveta et al., 2004). Además, la nefelometría también se ha aplicado para la realización de un antibiograma directo a partir de muestras de orina. Ilki et al., 2010 centrifugan los tubos del sistema UroQuick o HBandLTM que contienen las orinas incubadas y que han sido marcadas como positivas. Aprovechando el sedimento urinario, realizan mediante el sistema comercial automatizado VITEK2 la identificación del microorganismo y la susceptibilidad bacteriana. Mediante este procedimiento, se obtiene una concordancia >90% tomando como técnica de referencia la identificación a partir de colonia directa con el VITEK2 y la susceptibilidad antibiótica obtenida mediante la técnica disco-placa. Por otro lado, Roveta et al., 2006 introducen, de forma manual en el sistema UroQuick o HBandLTM, una alícuota de la orina con cultivo positivo junto con el antibiótico a testar en los diferentes tubos que contienen un caldo de enriquecimiento. En 5 horas determinan la susceptibilidad antibiótica del microorganismo presente en la orina con una concordancia superior al 90% respecto a los resultados de sensibilidad obtenidos mediante difusión en disco-placa.

Microarrays

La metodología de los microarrays se basa en el uso de un soporte sólido que alberga un gran número de moléculas de ácido nucleico de una sola cadena. Estos fragmentos de ácido nucleico reciben el nombre de sondas, y suelen ir marcadas mediante enzimas, fluorocromos, etc. Los ácidos nucleicos de las muestras a estudio, se incuban en presencia de las sondas, favoreciendo la hibridación. Finalmente, mediante sistemas informatizados, es posible determinar en dichas muestras la secuencia del ácido nucleico, así como, variaciones en la secuencia de los genes y de su expresión (Miller et al., 2009). Para el estudio de la sensibilidad antibiótica, los microarrays permiten la

detección de un gran número de genes de resistencia en un solo ensayo. En bacterias Gram negativas es posible detectar, en unas horas, un gran número de genes que codifican diferentes beta-lactamasas (Cohen et al., 2010; Naas et al., 2011; Peter et al., 2012).

Microfluidos

Los grandes avances en nanotecnología han permitido la miniaturización de distintos ensayos para la detección de resistencias bacterianas. Se utilizan plataformas o chips que trabajan con pequeños volúmenes de muestra y reactivos, y que permiten a su vez, albergar múltiples ensayos como cultivo bacteriano, hibridación y amplificación de ácidos nucleicos o rotura celular. De esta manera, los métodos de detección varían dependiendo del ensayo que se ha realizado (Pulido et al., 2013). Tang et al., 2013 desarrollan un soporte con un sensor capaz de detectar los cambios de PH que se producen tras la acumulación de productos metabólicos y en consecuencia detectar el crecimiento bacteriano. Esta metodología permite obtener resultados de CMI en 4 horas. Finalmente, Mach et al., 2011 realizan un antibiograma directamente a partir de muestras de orina utilizando un sistema de microfluidos que incorpora un sensor electroquímico para la cuantificación del RNA ribosómico 16S. Este grupo consigue, en 3 horas y media, un 94% de concordancia con la sensibilidad obtenida mediante microdilución en caldo.

1.9.- ELABORACIÓN DE DISPOSITIVOS *POINT OF CARE*

1.9.1.- Fases del proceso de desarrollo sistemático de un producto

Debido a las dificultades implicadas en el desarrollo de productos, las actividades de diseño tienen múltiples facetas. Por un lado, dependen del conocimiento científico y tecnológico básico, pero también de la experiencia de los distintos ingenieros de desarrollo en el área del producto en desarrollo.

Además, los diseñadores del producto tienen una responsabilidad en lo que al aspecto económico se refiere, de ahí la importancia de desarrollar un eficiente procedimiento o metodología de trabajo que permita alcanzar los objetivos marcados de la forma más coste-efectiva posible. Por otro lado, esta metodología debe de ser flexible y contar con un equipo de trabajo con los conocimientos adecuados.

Es importante distinguir entre ciencia del diseño y metodología de diseño. La ciencia del diseño utiliza el método científico para analizar la estructura de los sistemas técnicos y sus relaciones con el entorno, con el objetivo de desarrollar reglas para estos sistemas técnicos a partir de los elementos del sistema y sus relaciones. La metodología de diseño, sin embargo, es una forma de actuación concreta para el diseño de sistemas técnicos que obtiene su conocimiento a partir de las enseñanzas de la ciencia del diseño y de la psicología cognitiva, así como de la experiencia práctica en diferentes sectores. Incluye: planteamientos de acción para conectar las diferentes fases de trabajo y desarrollo de acuerdo a sus contenidos y a la organización planteada; estrategias, reglas y principios para alcanzar objetivos generales y específicos; y métodos para resolver problemas de diseño individuales o tareas parciales.

De acuerdo con este planteamiento, una metodología de diseño (o de desarrollo si se considera el proceso asociado a la creación y vida útil de un producto de manera más global) debe:

- ✓ Fomentar un acercamiento directo a los problemas.
- ✓ Promocionar la creatividad y el entendimiento.
- ✓ Facilitar la búsqueda de soluciones óptimas.
- ✓ Basarse en aplicación metódica de conocimientos.
- ✓ Ser compatible con conceptos, métodos y descubrimientos de otras disciplinas.
- ✓ Mantener el interés de los participantes.
- ✓ Ser fácilmente aprendida y enseñada.
- ✓ Reducir tiempos, costes y errores.

Este planteamiento debe llevar a los participantes en el desarrollo del producto a encontrar soluciones de una manera más rápida y práctica que si trabajasen en base a la intuición y experiencia.

Por otro lado, el empleo de procedimientos sistemáticos es importante para estructurar de forma apropiada los flujos de información del proyecto de desarrollo, así como,

preparar toda la documentación necesaria para la puesta en marcha de la producción del producto.

Según se detalla en la tesis doctoral de Díaz-Lantada A., 2009, los resultados de investigaciones anteriores, validados a través de numerosos productos desarrollados de forma satisfactoria, llevan con leves modificaciones a una estructura de trabajo (Roozenburg et al., 1995; Pahl et al., 1996; Muñoz-Guijosa et al., 2005; Ulrich et al., 2007) que incluye: planificación, diseño conceptual, ingeniería básica e ingeniería de detalle.

➤ **Definición de objetivos y planificación**

Es la decisión estratégica que toma una empresa, universidad o centro de investigación sobre qué productos o ideas se deben desarrollar para satisfacer nuevas necesidades sociales, teniendo en cuenta la situación tecnológica y socio-económica del momento.

Para que la idea de un producto sea exitosa, es necesario conocer la situación del mercado y más concretamente las necesidades de su población diana. No obstante, otros estímulos como los cambios políticos, la aparición de nuevas tecnologías, materiales, resultados de investigación y aspectos medioambientales potencian el desarrollo de nuevos productos.

En función de los estímulos comentados, las principales tareas que se incluyen en la fase de “definición de objetivos y planificación” son:

- ✓ Análisis de la situación:
 - La realización de un profundo estudio de la compañía y de sus productos, junto a un análisis del mercado, permite obtener un análisis completo de la situación de partida.
- ✓ Formulación de estrategias de búsqueda:
 - Teniendo en cuenta los objetivos, fortalezas y carencias de la empresa, así como las necesidades del mercado, se llega a establecer qué áreas o campos son los idóneos para plasmar la idea de un proyecto.
- ✓ Hallazgo de ideas de producto:
 - Dentro del campo elegido para el desarrollo del nuevo producto, se deben valorar distintos principios de funcionamiento, geometrías, materiales y otras alternativas, que puedan culminar en el producto final.

- ✓ Selección de ideas de producto:
 - Según los objetivos de la compañía y las necesidades de mercado se valoran el conjunto de ideas obtenidas para seleccionar la idea de producto más atractiva.
- ✓ Definición del producto a desarrollar:
 - Valorando las diferentes alternativas en base a la realización de una lista de requisitos se llega a una propuesta o definición de producto, acompañada por unos objetivos iniciales sobre costes, precios y plazos.

➤ **Diseño conceptual**

En esta fase, se establece una base que permite solucionar los problemas esenciales, el establecimiento de estructuras funcionales y la selección de principios apropiados que se puedan combinar para llegar al objetivo propuesto.

La consecución de esta fase de forma adecuada está supeditada al cumplimiento de los objetivos marcados en la fase anterior. Se debe de establecer un objetivo claro que sea viable tanto técnica como económicamente. El baluarte del Proyecto debe tener alternativas que permitan superar cualquier imprevisto que surja en esta fase de diseño conceptual y que permitan pasar a la fase de diseño o ingeniería básica.

En relación a lo anteriormente expuesto, las principales tareas incluidas en esta fase se detallan a continuación:

- ✓ Abstracción para la identificación de los problemas esenciales: Aquellas empresas que cuentan con una dilatada experiencia parten con ventaja, no obstante, esto en determinadas ocasiones puede convertirse en prejuicios o limitaciones que coarten el diseño creativo del producto. Por ello, lo ideal es que al principio del diseño de un nuevo producto, los diseñadores deben de realizar un esfuerzo de abstracción, que permita alejarse de las ideas convencionales y centrarse en analizar la lista de requisitos y formular los problemas esenciales de forma objetiva.
- ✓ Establecimiento de estructuras funcionales: Una vez formulado el problema a resolver, se debe obtener una función global que permita establecer una relación entre entradas y salidas de la planta, máquina, pieza o producto objeto del diseño. Posteriormente dicha función global puede dividirse en subfunciones de

menor complejidad y más bajo nivel de abstracción, que puedan ser tratadas individualmente para facilitar la búsqueda de soluciones. La combinación y relación entre estas subfunciones constituye la denominada estructura funcional. Es recomendable obtener diversas estructuras funcionales que permitan aportar diferentes alternativas según se deseen optimizar costes, funcionalidades, calidad, tiempo de desarrollo y otros factores.

- ✓ Desarrollo de estructuras de funcionamiento: Tras definir las distintas estructuras funcionales se debe buscar principios de funcionamiento para cada una de las subfunciones. Posteriormente, deben interconectarse estas subfunciones que den lugar a distintas estructuras de funcionamiento posible para cumplir con la función global. En función de los costes, plazos y calidad predefinida se pueden elegir unas estructuras de funcionamiento u otras.
- ✓ Obtención del principio resolutivo: A partir de las estructuras de funcionamiento, se obtienen distintos principios resolutivos en base a distintos criterios técnicos y económicos y a cálculos preliminares que llevan a seleccionar el principio resolutivo más adecuado sobre el que trabajar.

➤ **Ingeniería básica**

Una vez elaborado el principio resolutorio es el momento de concretar las ideas subyacentes a dicha propuesta preliminar de solución o concepto de producto. Durante la fase de ingeniería básica, los ingenieros de desarrollo tienen la misión de definir las formas y geometrías fundamentales que definen el producto, debiendo también seleccionar los materiales preliminares y procesos de fabricación asociados. Es en esta fase cuando las consideraciones técnicas, tecnológicas y económicas cobran una importancia vital. En otras palabras, esta fase se encarga de proporcionar un esquema general definitivo del producto en desarrollo, sobre el que se puedan analizar de forma eficaz: función, duración, fabricación, montaje, funcionamiento, costes y seguridad.

Al contrario que en la fase de diseño conceptual, la fase de ingeniería básica está sujeta a numerosas actividades de verificación, por lo que las tareas de análisis y de síntesis se alternan y complementan en todo momento. Además, es necesario realizar grandes esfuerzos relacionados con recopilación de información para facilitar la evaluación de soluciones, la identificación de errores y la optimización continua.

La complejidad de esta etapa es también mayor por la necesidad de realizar numerosas acciones simultáneamente, por la obligación de repetir algunas tareas cuando se alcanzan mayores niveles de información y porque las modificaciones en un área repercuten en el resto. Por todo ello no se puede establecer una serie de pasos que, seguidos de forma estricta, garanticen llevar a cabo la ingeniería básica de forma exitosa. Sin embargo se puede seguir la siguiente aproximación en términos generales:

- ✓ Selección de los requisitos que tienen una importancia vital en la etapa de ingeniería básica.
- ✓ Realización de dibujos a escala con las restricciones espaciales existentes y evaluando los espacios libres necesarios.
- ✓ Elaboración de un esquema básico para determinar los componentes que se encargan de satisfacer las funciones principales.
- ✓ Diseños preliminares de los elementos y componentes que cumplen dichas funciones principales.
- ✓ Elaboración de un esquema básico para determinar los componentes que se encargan de satisfacer el resto de funciones auxiliares.
- ✓ Diseños preliminares de los elementos y componentes que cumplen dichas funciones auxiliares.
- ✓ Evaluación de diseños con criterios tanto técnicos como económicos.
- ✓ Determinación del diseño preliminar global.
- ✓ Optimización del diseño seleccionado, eliminando los puntos débiles que hayan aparecido durante la evaluación.
- ✓ Propuestas de mejoras y verificación del logro de los objetivos de costes y calidad.
- ✓ Preparación de lista preliminar de piezas y documentación, también básica, para producción y montaje. Dicha documentación constituye el punto de partida para la fase de ingeniería de detalle.

Presenta gran interés durante la etapa de ingeniería básica emplear listas de verificación para comprobar que en el diseño de los distintos componentes destinados a formar parte del producto, cumplen con las funciones del mismo, y que se han tenido en cuenta varios aspectos como:

- ✓ Función.
- ✓ Principio de funcionamiento.

- ✓ Diseño.
- ✓ Seguridad.
- ✓ Normativa.
- ✓ Ergonomía.
- ✓ Fabricación.
- ✓ Control de calidad.
- ✓ Montaje.
- ✓ Transporte.
- ✓ Operación.
- ✓ Detección de fallos.
- ✓ Reciclaje.
- ✓ Mantenimiento.
- ✓ Coste.
- ✓ Plazo.

Como complemento de esta fase, es importante la comparación de diseños y comprobación de geometrías y funcionalidades mediante prototipos. De esta manera, se minimizarán los plazos y costes del desarrollo del producto.

Entre los prototipos a preparar encontramos los virtuales, fruto de programas de diseño, simulación, cálculos y fabricación asistida por ordenador (programas “CAD-CAE-CAM”). Por otro lado, tenemos los prototipos físicos, definidos como “ejemplar original de un producto para la realización de pruebas y verificaciones”.

La aparición del diseño virtual mediante softwares especializados en el desarrollo industrial de un producto, ha motivado cambios cruciales en cuanto a la forma de llevar a cabo los procesos de desarrollo, facilitando tareas de intercambio de información y permitiendo valorar múltiples variables de forma combinada que optimizarán la elección del material a emplear y el proceso de fabricación final.

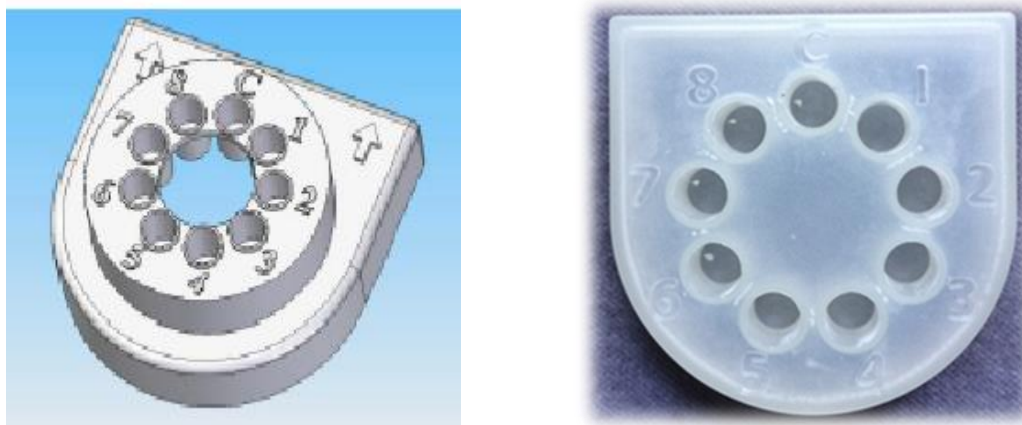


Figura 2. Diseño virtual y prototipo del elemento Receptor del dispositivo *POC* para la detección de ITU y antibiograma rápido de Diagnochip®.

En los últimos años, está siendo cada vez más frecuente paquetes de software que combinan diferentes módulos para solucionar los problemas anteriormente expuestos.

Estas tecnologías son de gran ayuda en las etapas asociadas al desarrollo del producto, producción, comercialización y actividades postventa. Sus principales ventajas se ponen de manifiesto al llegar a la etapa de ingeniería básica, siendo su empleo aún más importante en la fase de ingeniería de detalle.

En lo que a los prototipos físicos respecta, es importante resaltar la importancia industrial que han adquirido las denominadas “tecnologías de fabricación y prototipados rápidos”. Estas tecnologías permiten obtener en cortos espacios de tiempo piezas físicas directamente de los diseños realizados con ordenador. Supone una gran ventaja, a la hora de optimizar el diseño y en la detección temprana de errores y puesta en marcha de la producción.

En función del objetivo y del parecido con el producto final, los prototipos físicos se suelen dividir en los tres niveles siguientes:

- Prototipos de nivel “A” (comúnmente “A-samples”). Se trata de prototipos para demostración con los que analizar formas, geometrías y otros aspectos más subjetivos (como la estética, el impacto visual o la ergonomía) relacionados con el producto en desarrollo.
- Prototipos de nivel “B” (comúnmente “B-samples”). Son prototipos funcionales destinados a verificar el comportamiento de distintas partes del producto y de sus funcionalidades. No obstante, al estar fabricados generalmente en materiales no definitivos, dichas pruebas suelen realizarse limitando ciertas solicitudes.

- Prototipos de nivel “C” (comúnmente “C-samples”). Son ya prototipos con materiales y comportamiento similar al del producto final aunque los métodos de fabricación empleados para su obtención pueden no coincidir con los métodos empleados en producción. Estos prototipos de nivel “C” suelen fabricarse para comprobaciones finales, para preparación de la puesta en producción y en tareas de homologación, dentro de la etapa de ingeniería de detalle que se comenta más adelante.

El final de la fase de ingeniería básica y el comienzo de la fase de ingeniería de detalle no se puede acotar de forma precisa, pudiendo superponerse ambas fases, lo cual repercute de forma positiva en el proceso global.

Una vez definido el diseño básico definitivo, se llevan a cabo los procedimientos necesarios para terminar de definir las formas finales, así como los materiales, dimensiones o propiedades de los distintos componentes. Se realiza también la selección final de métodos de fabricación y montaje, así como la evaluación final de costes. El resultado final de esta fase es la información técnica del producto: lista de funcionalidades, planos de fabricación, instrucciones de montaje etc. En base a esta información, se puede abordar la puesta en producción y comercialización del producto. De acuerdo con esto, las principales tareas en las que se puede dividir la etapa de ingeniería de detalle son:

- Finalización del diseño definitivo: En la que los distintos componentes se definen por completo por medio de planos y se explicitan materiales, tolerancias, ajustes y otros detalles.
- Integración de componentes: Por medio de planos de conjunto o archivos “CAD” de montaje en los que el producto se define de forma global.
- Finalización de documentos: Para definir inequívocamente el producto y poder lanzar la producción.
- Comprobaciones finales: Sobre cumplimiento de normativas generales y de la propia compañía, precisión de dimensiones y tolerancias, disponibilidad de elementos estándar o de catálogo y otras verificaciones.

1.9.2.- Materiales: Ventajas del plástico

La elección de materiales para su uso en el mercado médico o farmacéutico puede resultar una tarea complicada. El aspecto económico y el cumplimiento de la estricta normativa reguladora condicionan la elección del material para la fabricación de dispositivos médicos.

El plástico es un material que se puede fabricar a gran escala en plantas con una capacidad de salida de miles de toneladas por año. En consecuencia, el principal objetivo de los fabricantes es la eficiencia operativa, la inversión al menor coste posible en un estándar de calidad específico y la tasa de utilización máxima de la producción.

La mejora continua dentro de este contexto supone el aumento de la eficiencia de coste optimizando los parámetros de producción y los procesos de simplificación e incrementando la eficiencia de las ayudas y facilidades de producción, así como empleando aditivos más eficientes.

Su bajo coste en comparación con el vidrio y materiales metálicos, hacen que el plástico a menudo pueda ser eliminado y por lo tanto no necesita ser esterilizado para su reutilización. Además, los plásticos pueden ser moldeados en configuraciones útiles que serían difíciles o imposibles de duplicar en el vidrio y los metales. Asimismo, no se rompen como el cristal y son fuertes y flexibles.

Las resinas más utilizadas en plásticos médicos son cloruro de polivinilo (PVC), polietileno, polipropileno y poliestireno. Pero policarbonatos, ABS, poliuretanos, poliamidas, elastómeros termoplásticos, polisulfonas y polieteretercetona (PEEK) están encontrando aplicaciones especializadas en productos sanitarios, especialmente cuando se requiere un alto rendimiento. Resinas PEEK están reemplazando cada vez más el titanio, la cerámica y otras resinas en aplicaciones de implantes ortopédicos.

El uso del plástico ha revolucionado el campo de la medicina haciendo que los procedimientos resulten más seguros y simples para los pacientes.

La preocupación por las infecciones hospitalarias ha tenido un gran impacto en el mercado del plástico, ya que para los proveedores del sector sanitario, resulta cada vez más importante esterilizar continuamente los dispositivos médicos. Sin embargo, con el uso del plástico se pueden conseguir productos desechables, reduciendo así, la necesidad de esterilizar el material sanitario y minimizando la carga asistencial.

Por otro lado, la incorporación del plástico en la medicina ha aumentado de manera exponencial en la última década. El plástico ha contribuido a una reducción de los costes médicos y de las enfermedades infecciosas. Polímeros de alta tecnología se utilizan para crear nuevas y mejoradas extremidades artificiales y dispositivos de administración desechables de plástico han tenido éxito en la reducción del riesgo de infección para los pacientes. Por tanto, los pacientes se ven beneficiados con el uso de este material, lo cual repercute en su calidad de vida.

Cabe destacar el importante ahorro de costes adicionales que supone la utilización de este material en los equipos médicos y la atención que ahora se puede proporcionar en el hogar, con el uso eficaz y sencillo de dispositivos médicos portátiles que están diseñados para ser usados por el paciente fuera del hospital. Estos dispositivos médicos portátiles incluyen herramientas de diagnóstico rápido, medidores de glucosa en sangre u oxímetros de pulso, entre otras muchas opciones.

El cuidado de la salud a domicilio está tratando de ser el segmento de superación de este mercado, ya que los avances tecnológicos permiten que los pacientes tengan a su disposición una gran variedad de dispositivos *Point of Care*, con los cuales auto-diagnosticarse, e incluso seleccionar el tratamiento más adecuado en primera instancia.

1.9.3.- Normativa en el desarrollo de dispositivos médicos

Directivas

En relación al desarrollo de dispositivos médicos dentro de la Unión Europea hay tres directivas (y enmiendas asociadas) que deben ser tenidas en cuenta para poder comercializar los productos en desarrollo:

- Directiva **93/42/EEC** relativa a los dispositivos médicos.
- Directiva **90/385/EEC** relativa a los dispositivos médicos implantables activos.
- Directiva **98/79/EC** relativa a los dispositivos médicos para diagnóstico “*in vitro*”.

Directiva 93/42/EEC relativa a los dispositivos médicos

Esta directiva se aplica a los dispositivos y accesorios médicos, donde un “dispositivo médico” puede definirse como “cualquier instrumento, aparato, herramienta, material u

otro artículo, ya se use solo o en combinación con otros, incluido el sistema operativo necesario para su correcta aplicación prevista por el fabricante para utilizarse en seres humanos”. Un “accesorio médico” es un artículo que, aunque no es un dispositivo, se ha fabricado con el objetivo de utilizarse junto con un dispositivo de tal manera que su uso esté de acuerdo con el uso del dispositivo previsto por el fabricante del mismo.

Los dispositivos médicos se dividen en clases, en función de las normas de clasificación establecidas en el Anexo IX de la directiva. La aplicación de estas normas de clasificación se rigen por la finalidad prevista del dispositivo, los riesgos asociados a su empleo, el grado de contacto con tejidos del organismo o el tiempo de permanencia en el cuerpo humano. Así los dispositivos médicos por orden de peligrosidad/responsabilidad creciente pueden ser de: “Clase I”, “Clase II a”, “Clase II b” o “Clase III”.

Antes de fabricar y comercializar el dispositivo, el fabricante o su representante autorizado establecido en la Unión Europea, debe someterlo a distintos tipos de controles, en función de la clasificación del dispositivo, para poder colocar en el dispositivo el marcado CE. Dichos controles son los siguientes:

Para dispositivos de Clase I:

Para dispositivos esterilizados y dispositivos con función de medición se debe obtener, antes de su comercialización, la “declaración de conformidad CE” y, a elección del fabricante o representante:

- La “verificación CE” por parte de un organismo notificado.
- La aprobación del “sistema de la calidad de producción” por parte de un organismo notificado.
- La aprobación del “sistema de calidad del producto” por parte de un organismo notificado.

Otros dispositivos deben superar el “control de producción interno”, es decir, preparar y someter a evaluación toda la documentación técnica que permita la verificación de la conformidad del producto con los requisitos de las directivas.

Para dispositivos de Clase II a:

Estos productos deben obtener a elección del fabricante o representante:

- La “declaración de conformidad CE” y en función de su elección:
 - La “verificación CE” por parte de un organismo notificado.
 - La aprobación del “sistema de la calidad de producción” por parte de un organismo notificado.
 - La aprobación del “sistema de calidad del producto” por parte de un organismo notificado.
- Como alternativa el fabricante debe recibir la aprobación del “sistema de aseguramiento de la calidad total” por un organismo notificado, con la excepción de la aplicación del examen del diseño del producto.

Para dispositivos de Clase II b:

Estos productos deben obtener a elección del fabricante o representante:

- El “examen CE de tipo” y en función de su elección:
 - La “verificación CE” por parte de un organismo notificado.
 - La aprobación del “sistema de la calidad de producción” por parte de un organismo notificado.
 - La aprobación del “sistema de calidad del producto” por parte de un organismo notificado.
- Como alternativa el fabricante debe recibir la aprobación del “sistema de aseguramiento de la calidad total” por un organismo notificado, con la excepción de la aplicación del examen del diseño del producto.

Para dispositivos de Clase III:

Estos productos deben obtener a elección del fabricante o representante:

- El “examen CE de tipo” y en función de su elección:
 - La “verificación CE” por parte de un organismo notificado.
 - La aprobación del “sistema de la calidad de producción” por parte de un organismo notificado.
 - La aprobación del “sistema de calidad del producto” por parte de un organismo notificado.

- Como alternativa el fabricante debe recibir la aprobación del “sistema de aseguramiento de la calidad total” por un organismo notificado, incluida la aplicación del examen del diseño del producto por parte de un organismo notificado.

Para aquellos dispositivos destinados a investigación clínica y fabricados a medida, el fabricante debe preparar una declaración, conforme a los criterios establecidos en el Anexo VIII de la directiva. Estos dispositivos no tienen que llevar el distintivo CE.

La directiva no identifica ninguna norma de sistema de la calidad, pero los requisitos proporcionados para la creación del sistema de la calidad están sujetos a la Serie ISO 9000 en relación al sistema de calidad total, al sistema de calidad de producción y al sistema de calidad del producto final.

Para valorar la competencia técnica de los organismos notificados, los países miembros de la UE deben aplicar los criterios establecidos en el Anexo XI de la directiva.

Directiva 90/385/EEC relativa a los dispositivos médicos implantables activos

Esta directiva se aplica a los dispositivos médicos implantables activos, es decir, a “cualquier dispositivo médico (según ya se ha definido) que dependa para su funcionamiento de una fuente de energía eléctrica (o cualquier fuente de energía que no sea generada directamente por el cuerpo humano o por la acción de la gravedad) y que deba introducirse total o parcialmente, por medios quirúrgicos o médicos, en el cuerpo humano, o por intervención médica en un orificio natural y quedar instalado permanentemente tras el procedimiento”.

Antes de comercializar su producto, el fabricante debe someterlo a los procedimientos de evaluación de conformidad que se establecen en la directiva. Excepto para los dispositivos médicos hechos a medida y los destinados a investigación clínica, el fabricante puede optar por:

- Seguir el procedimiento relativo a la “declaración de conformidad CE” (aprobación y control del sistema de calidad total por parte de un organismo notificado) complementado con el examen del diseño del producto.
- Someter a un modelo al “examen CE de tipo” por parte de un organismo notificado en combinación con uno de los siguientes procesos:

- La “verificación CE” por parte de un organismo notificado.
- La “declaración de conformidad CE”.

Para los dispositivos destinados a investigación clínica y dispositivos fabricados a medida, el fabricante debe preparar una declaración específica. Estos dispositivos no tienen que llevar el marcado CE.

Esta directiva tampoco identifica ninguna norma de sistema de la calidad, pero los requisitos proporcionados para la creación del sistema de la calidad están sujetos a la Serie ISO 9000 en relación al sistema de calidad total, al sistema de calidad de producción y al sistema de calidad del producto final.

Directiva 98/79/EC relativa a los dispositivos médicos para diagnóstico “*in vitro*”

Hasta 2017, todos los sistemas y pruebas diagnósticas, utilizadas en los estados miembros de la Comunidad Europea, debían cumplir los requisitos establecidos en la Normativa Europea 98/79/EC sobre diagnóstico *in vitro*, modificada en 2010 por la Comisión Europea. Esta normativa no hace una alusión específica a las pruebas rápidas ni a los POC, por lo que a estas no se les supone ningún requerimiento específico más allá de los exigibles a cualquier otra prueba o dispositivo destinado al diagnóstico *in vitro*.

Es por esto que con el objetivo de regularizar y mantener los más altos estándares de protección y seguridad de la salud, algunos países han establecido sus propias recomendaciones en relación al uso de estas pruebas. En Estados Unidos, la *Joint Commission on the Accreditation of Healthcare Organizations* (JCAHO) y el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), disponen de recomendaciones específicas en este tema. En Reino Unido, el *Standards for the Medical Laboratory, Clinical Pathology Accreditation* (UK) establece recomendaciones específicas para los POC. En Irlanda varias sociedades publicaron un documento de recomendaciones para el uso de las pruebas POC en atención primaria. La Sociedad Brasileña de Patología Clínica/ Medicina de Laboratorio, publicó en el 2004 “Directivas para la gestión y garantía de la calidad de puntos periféricos de obtención y recogida de especímenes (POC)”. En dicho país ya existe una regulación que obliga a los laboratorios clínicos a supervisar el uso de estos dispositivos. El Instituto de Salud pública de Chile recomienda adquirir aquellos POC que presenten certificaciones de fabricación ISO 13485 o certificaciones de la

Comunidad Económica Europea (CEE) que den cumplimiento a la Directiva 98/79/CE o que cuenten con aprobación FDA.

En el año 2017, se publica el Reglamento 2017/746 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* y por el que se derogan la Directiva 98/79/CE y la Decisión 2010/227/UE de la Comisión. Este documento clasifica los sistemas y dispositivos de diagnóstico *in vitro* en 5 clases (A-D) en función de sus características y los usos a que están destinados. Mientras que los dispositivos de autodiagnóstico se engloban en la clase C, no establece una categoría específica para los POC, literalmente “los productos para pruebas diagnósticas en el lugar de asistencia al paciente se clasifican por sí mismos”. Dentro de la clase C se englobarían los productos destinados a:

- a) La detección de la presencia de un agente de transmisión sexual o la exposición al mismo.
- b) La detección en el líquido cefalorraquídeo o la sangre de la presencia de un agente infeccioso sin un riesgo elevado o supuestamente elevado de propagación.
- c) La detección de un agente infeccioso, si existe un riesgo importante de que un resultado erróneo cause la muerte o una discapacidad grave del feto, del embrión o de la persona objeto de ensayo, o de la descendencia de esta persona.
- d) La determinación, a efectos de monitorización prenatal de las mujeres, el estado inmunológico de las mujeres frente a patógenos transmisibles.
- e) La determinación del estado inmunológico o de infección, si existe un riesgo de que un resultado erróneo induzca a tomar una decisión que pueda poner en peligro inminente la vida del paciente o de su descendencia.
- f) Ser utilizados como pruebas diagnósticas para selección terapéutica.
- g) Ser utilizados para la estadificación de una enfermedad, cuando exista un riesgo de que un resultado erróneo induzca a tomar una decisión que pueda poner en peligro la vida del paciente o de su descendencia.
- h) Ser utilizados en el cribado, el diagnóstico o la estadificación del cáncer.
- i) La realización de pruebas genéticas humanas.
- j) El seguimiento del nivel de medicamentos, sustancias o componentes biológicos, si existe un riesgo de que un resultado erróneo induzca a tomar

una decisión que pueda poner en peligro la vida del paciente o de su descendencia.

- k) La gestión de los pacientes con una enfermedad o condición que ponga en peligro la vida.
- l) El cribado para detectar trastornos congénitos en el embrión o en el feto.
- m) El cribado para detectar trastornos congénitos en los recién nacidos, cuando la omisión de la detección y el tratamiento de tales trastornos pueda poner en peligro la vida o ser causa de discapacidad grave.

Los fabricantes de productos de pruebas de autodiagnóstico y/o POC incluidas en cualquiera de las clases, deberán presentar documentación técnica acreditativa a un comité evaluador que será el responsable de evaluar y verificar la conformidad del producto. Si el producto es conforme se expedirá un certificado de la Unión Europea en el que constarán las conclusiones de la evaluación, las condiciones de su validez, los datos necesarios para la identificación de los productos aprobados y, en su caso, una descripción de la finalidad prevista del producto.

Este reglamento también establece medidas de protección frente a los riesgos de las pruebas POC y de autodiagnóstico:

- Los productos para autodiagnóstico o pruebas diagnósticas en el lugar de asistencia al paciente se diseñarán y fabricarán de forma que funcionen según su finalidad prevista, teniendo en cuenta las habilidades y los medios a disposición del usuario y la influencia de las variaciones que cabe anticipar en la técnica y el entorno de dicho usuario. La información y las instrucciones que proporciona el fabricante serán de fácil comprensión y aplicación para que el usuario pueda interpretar correctamente el resultado proporcionado por el producto y para evitar información que se preste a confusión. En el caso de pruebas diagnósticas en el lugar de asistencia al paciente, la información y las instrucciones facilitadas por el fabricante deberán precisar el nivel de formación, cualificaciones y/o experiencia requerida por el usuario.
- Los productos para autodiagnóstico o pruebas diagnósticas en el lugar de asistencia al paciente se diseñarán y fabricarán de forma que:

- a) Se garantice que el producto pueda ser utilizado de forma segura y fiable por el usuario previsto en todas las fases del procedimiento, en caso necesario previa formación o información.
 - b) Se reduzca todo lo posible el riesgo de error, por parte del usuario previsto, en la manipulación del producto y, en su caso, de la muestra y también en la interpretación de los resultados.
- Los productos para autodiagnóstico o pruebas diagnósticas en el lugar de asistencia al paciente dispondrán, cuando sea factible, de un procedimiento por el que el usuario previsto:
- a) Pueda verificar que, en el momento de su utilización, el producto funciona de acuerdo con lo previsto por el fabricante.
 - b) Reciba una advertencia si el dispositivo no ha dado un resultado válido.

Normativa específica. ISO 15189 e ISO 22870

En la actualidad son muchos los laboratorios de Microbiología que cuentan con sistemas de gestión de la calidad bajo la normativa ISO 9001. La aplicación de esta norma certifica la calidad de los procesos y servicios que se llevan a cabo en cualquier tipo de organización, asegurando que el servicio prestado cumple unos requisitos mínimos de calidad. Sin embargo, esta norma no hace referencia a los aspectos técnicos de los servicios prestados. La norma ISO 15189 está destinada no solo a la implantación de un sistema de gestión de la calidad, sino de forma específica a garantizar la competencia de los procesos que se llevan a cabo en los laboratorios clínicos, de forma que un proceso acreditado bajo los estándares de esta norma garantiza, no solo que cumple con unos estándares mínimos de calidad, sino que el responsable de dicho proceso cuenta con la competencia técnica necesaria para asegurar su calidad y validez, desde la petición de la muestra hasta la validación de los resultados.

Es oportuno recordar en este punto que las pruebas POC están destinadas al diagnóstico y por lo tanto su utilización, independientemente del lugar de realización, deberá estar sometida a los mismos estándares de calidad que cualquier otra prueba diagnóstica. Esto en sí supone la necesidad de un control y supervisión, por parte de los laboratorios especializados, que garantice la fiabilidad, seguridad y validez de los resultados proporcionados. Estas pruebas deben ser consideradas como parte del diagnóstico

realizado en el laboratorio y por tanto incorporadas en su sistema de gestión de la calidad.

La norma ISO 22870:2006, actualizada en 2016, establece los requerimientos específicos para la acreditación del diagnóstico POC independientemente que este se lleve a cabo a nivel hospitalario o ambulatorio. La aplicación de esta norma debe ir estrechamente en conjunción con la norma ISO 15189 de acreditación del laboratorio clínico. La implantación de estos sistemas de gestión de la calidad y la competencia garantiza:

- Una correcta evaluación y selección de las pruebas.
- El control de los procedimientos pre-analíticos, analíticos y post-analíticos.
- El control de la información y los procesos.
- La formación del personal y requisitos técnicos.
- Control de equipos y bioseguridad.
- Mejora continua, acciones preventivas y correctivas.
- Criterios de validez de los resultados y aseguramiento de la calidad.

Esta norma no hace una referencia específica a las pruebas de autodiagnóstico pero le son aplicables gran parte de los criterios incluidos en ella.

También en el caso del desarrollo de dispositivos médicos, el seguimiento en términos generales de las recomendaciones sobre calidad y procedimientos disponibles en las normas de la serie ISO 9000, junto con algunas puntualizaciones de las normas ISO 13485 y 13488, si bien no son de obligatorio cumplimiento, sí que ayudan al desarrollo adecuado de los dispositivos y sirven para demostrar la conformidad con los requisitos que establecen las tres directivas específicas explicadas y concretamente permitir la colocación del mercado CE.

Por otro lado, existen ciertas normas y documentos relacionados con aspectos muy concretos del desarrollo de dispositivos médicos que merecen la pena ser nombrados y aplicados para el desarrollo de un producto de este sector que se quiera comercializar, como:

- **Norma ISO 13485** sobre “Productos sanitarios. Sistemas de gestión de la calidad y requisitos reglamentarios”. Establece los requisitos para un sistema de gestión de la calidad donde una organización precisa demostrar su habilidad para diseñar, desarrollar, suministrar productos sanitarios y servicios relacionados que cumplan consistentemente los requisitos del cliente y reglamentarios aplicables a los productos sanitarios y

servicios relacionados. El objetivo principal de la ISO 13485 es facilitar los requisitos reglamentarios armonizados para sistemas de gestión de la calidad de los productos sanitarios. Como resultado, incluye algunos requisitos particulares para productos sanitarios y excluye algunos requisitos de la Norma ISO 9001.

- **Norma ISO 13488** sobre “Sistemas de calidad. Productos sanitarios y requisitos particulares para aplicación de la Norma ISO 9002”. Especifica, de forma conjunta con la Norma ISO 9002, los requisitos sobre el sistema de calidad de una empresa para la producción, instalación y distribución de dispositivos médicos.
- **Norma ISO 14971** sobre “Aplicación de la gestión de riesgos a los productos sanitarios”. Muestra el proceso a seguir por los diseñadores para identificar los riesgos asociados a los dispositivos médicos, incluyendo aquellos destinados a diagnóstico “*in vitro*”, para estimar y evaluar dichos riesgos, intentar controlarlos mediante acciones correctoras y verificar el impacto y eficacia de tales acciones correctoras. Puede aplicarse a todas las etapas del ciclo de vida del dispositivo médico considerado.
- **Norma ISO 15223** sobre “Símbolos utilizados en las etiquetas, en el rotulado y en la información suministrada con los dispositivos médicos”. Identifica los requisitos para el desarrollo y empleo de símbolos que puedan estar destinados a aportar información sobre la utilización segura y eficaz de dispositivos médicos. Dichos símbolos pueden ir grabados sobre el propio dispositivo médico o en su empaquetamiento, así como en la información que los acompañe.

Además de estas normas de carácter general, a lo largo del proceso de desarrollo de estos productos es de gran importancia recurrir a normativa específica relacionada con métodos de caracterización y ensayo de distintos materiales, para poder hacer estudios comparativos entre distintas alternativas y facilitar la elección del proveedor.

No obstante, la normativa va evolucionando con el tiempo para adaptarse a las nuevas exigencias de seguridad y calidad del mercado, por lo que es importante consultar regularmente las referencias actualizadas (www.iso.org).

Situación en otros países

En general, para evaluar la biocompatibilidad de un dispositivo médico, aquellas estrategias que cumplan con los criterios expuestos en la Norma 10993 resultan aceptables tanto en Europa como en Asia (Kucklick et al., 2006).

No obstante, en Estados Unidos, los procedimientos de ensayo de la “U.S. Pharmacopeia”, utilizados para la posterior solicitud de certificación del producto por la *Food and Drug Administration* (FDA), presentan ciertas diferencias respecto a las propuestas de las normas ISO. Los procedimientos ISO tienden a ser más estrictos y exigentes por lo que las empresas con intención de comercializar sus productos tanto en Europa como en Estados Unidos, deben de seguir las normas propuestas por ISO.

En todo caso, a pesar de decantarse por los métodos ISO, en caso de comercializarse en Estados Unidos, deben comprobarse los requisitos impuestos por la FDA por si fuese necesario algún ensayo adicional.

Investigación y normativa

Según se ha mostrado en el análisis sobre las Directivas de nuevo enfoque relacionadas con dispositivos médicos, para aquellos productos destinados a tareas de investigación clínica y para dispositivos fabricados a medida, el fabricante debe preparar una declaración, de acuerdo con los criterios de la Directiva correspondiente, pero no es necesario someterse a exámenes tan estrictos como en el caso de productos destinados al mercado. De hecho los dispositivos médicos para investigación o fabricados a medida no tienen que llevar el marcado CE.

Parece lógica cierta relajación en la aplicación e imposición de normativas a los dispositivos de investigación, cuya finalidad en muchas ocasiones, es demostrar la viabilidad de un determinado principio funcional de un producto a introducir en el mercado. Dicha concesión, está destinada a fomentar el espíritu creador y a no desechar grandes ideas por su difícil acoplamiento a la normativa vigente. Al contrario, se fomenta la realización de estudios de viabilidad técnica y económica en relación a la utilización de materiales o tecnologías novedosas. Los resultados de estos estudios desembocan en la llegada al mercado de nuevos y novedosos dispositivos médicos.

Por último, es importante hacer referencia a la “Declaración de Helsinki” promulgada por la Asociación Médica Mundial en 1964 con seis enmiendas posteriores, la última de ellas y actualmente en vigor realizada en 2008. Se trata de una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. Trata también aspectos éticos asociados a las pruebas “*in vivo*” realizadas en animales como paso previo a las realizadas en humanos.

Aunque su aplicación no sea obligatoria de cara a introducir un nuevo dispositivo médico en el mercado, esta declaración constituye un conjunto de principios éticos que pueden guiar y ayudar a tomar decisiones a todos los investigadores en temas relacionados con la salud pública. Estas decisiones finalmente están enfocadas a garantizar el bienestar de las personas que participan en el proceso de investigación y obtener los productos sanitarios más seguros y eficaces.

2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN:

La empresa chilena Diagnochip[®], en colaboración con la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), el Hospital Universitario La Paz (HULP-Madrid), el Hospital Universitario Puerta de Hierro (HUPH-Madrid) y el Hospital Universitario de La Ribera (HULR-Alzira, Valencia) ha desarrollado un dispositivo médico tipo “*Point of Care*” para la detección de bacteriuria significativa y antibiograma rápido en pacientes con sospecha de cistitis.

En relación con el diagnóstico de la infección urinaria y con las técnicas microbiológicas convencionales, urinocultivo y antibiograma, es necesario tener presente que:

1. En muchas áreas sanitarias, especialmente en áreas descentralizadas y en países en vías de desarrollo, la posibilidad de disponer de los servicios de un laboratorio de Microbiología es prácticamente impensable por motivos tales como: la imposibilidad de infraestructuras, economía precaria, ausencia de personal especializado, etc.
2. Incluso en países desarrollados cuando se emplea la metodología convencional para la realización del urinocultivo y antibiograma, los resultados tardan entre 48 y 72 horas, e incluso más cuando se trata de zonas muy alejadas de los centros urbanos.

Por estos motivos, el desarrollo de un dispositivo de calidad, bajo coste, fácil de utilizar, que ofrezca información tan valiosa como estudios de sensibilidad antibiótica en una infección tan frecuente como la urinaria, y que pueda llegar a zonas de difícil acceso sanitario, cobra un gran interés.

HIPÓTESIS:

La empresa chilena Diagnochip[®] ha desarrollado un dispositivo médico tipo “*Point of Care*”, basado en la miniaturización de procesos, el cual es capaz de identificar la sensibilidad antibiótica en pacientes ambulatorios con infección urinaria.

El dispositivo que ha desarrollado Diagnochip[®], consta de un elemento Receptor compuesto por 9 micropocillos en los cuales se desarrolla el proceso microbiológico. Mediante el elemento Dispensador (pipeta multicanal) se incorpora la muestra de orina a la base de los micropocillos. Una vez inoculada la muestra de orina, se coloca el dispositivo en una estufa incubadora y al cabo de 7-10 horas se observa visualmente los resultados de la sensibilidad antibiótica: cambio de color implica que las bacterias contenidas en la muestra son resistentes; sin cambio de color significa que las bacterias son sensibles al antibiótico y, por ende, ese podría ser el antibiótico a recomendar al paciente.

Se pretende que el dispositivo sea de bajo coste y, dada su fácil utilización e interpretación de resultados, se distribuya en zonas geográficas en donde sea difícil la accesibilidad a laboratorios de Microbiología.

OBJETIVOS:

1. Objetivo Principal

Diseñar un dispositivo capaz de determinar la sensibilidad antibiótica mediante el empleo de una sustancia cromófora en pacientes con infección urinaria, en un lapso de tiempo no superior a 10 horas, desde la toma de la muestra en el punto de atención del paciente.

2. Objetivos Secundarios

2.1.- Diseñar un procedimiento o protocolo microbiológico que permita impregnar los micropocillos del dispositivo con los reactivos más adecuados para asegurar la mayor estabilidad posible de los mismos durante su almacenaje, determinar las concentraciones de medios de cultivo, antibióticos y cromóforos, así como los tiempos y condiciones de secado, incubación y límites de detección en un dispositivo basado en la miniaturización de procesos “*lab on a chip*”, a ser empleado en el punto de atención del paciente.

2.2.- Validar el dispositivo mediante ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*” para determinar la sensibilidad y la especificidad en relación con el antibiograma convencional.

2.3.- Diseñar un procedimiento o protocolo estándar que permita reproducir los resultados obtenidos en el dispositivo POC para la detección de ITU, en otros dispositivos médicos destinados a detectar infección en otras muestras biológicas.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS:

3.1.- DESARROLLO ESTRUCTURAL DEL DISPOSITIVO POC PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIÓN URINARIA Y ANTIBIOGRAMA RÁPIDO

Actualmente, el estudio moderno e integrado de problemas biomecánicos y bioquímicos en el diagnóstico de la enfermedad, se lleva a cabo a través de dispositivos basados en el fenómeno de la microfluídica. De hecho, los sistemas basados en la microfluídica han experimentado un crecimiento explosivo en las dos últimas décadas, promovido por la convergencia de técnicas de diagnóstico clínico y el diseño asistido por ordenador. Los diseños asistidos por ordenador y los recursos del prototipado rápido como marco versátil, para las potenciales pruebas en el punto de atención de las distintas enfermedades y su eventual respuesta a diferentes antibióticos, constituye una importante herramienta de cara al futuro.

En esta sección se presenta el proceso de desarrollo completo de un dispositivo *Point of care* (POC) basado en el fenómeno de la microfluídica. El dispositivo está dirigido a la detección precoz de la infección urinaria y a la elección del tratamiento antibiótico adecuado.

Se trata de un dispositivo POC diseñado para su uso en países en vías de desarrollo y zonas rurales remotas, donde el acceso a equipos especializados es muy difícil.

Los diseños conceptuales y el formato “*lab on a chip*” (dispositivo que integra una o varias funciones propias de un laboratorio en un formato de reducidas dimensiones), han permitido proponer diferentes enfoques y tecnologías, con el fin de validar un diseño y seleccionar los recursos más adecuados para las posteriores etapas de validación del proceso microbiológico con muestras clínicas.

El diseño conceptual de un “*lab on a chip*” se puede describir de la siguiente manera. Debe incluir una cámara central para la colocación de la muestra biológica y varios canales radiales para conducir la muestra de orina a un conjunto de pocillos situados en la periferia del dispositivo. Cada pocillo incluye un antibiótico diferente y un

cromóforo, reactivo que es metabolizado por las bacterias generando un cambio de color que permite al usuario seleccionar el antibiótico adecuado para el que la bacteria es sensible.

En consecuencia, se obtiene un dispositivo, cuya interpretación de resultados es sencilla, utilizado por personal no cualificado y que permite evitar instaurar un tratamiento empírico inadecuado que fomente el desarrollo de las resistencias bacterianas.

En este sentido, el uso de la microfluídica es muy interesante, ya que promueve un uso más sostenible de las muestras biológicas y una aceleración de las reacciones químicas para un diagnóstico más rápido. Además, su fácil incorporación a dispositivos médicos, permite una fabricación a gran escala potenciando el impacto social.

Asimismo, el uso de la acción capilar para la conducción de muestras biológicas requiere de características micrométricas (canales) y tecnologías de fabricación capaces de trabajar a micro-escala. En nuestro caso, los diferentes prototipos del futurible dispositivo POC se han obtenido a partir de un amplio abanico de prototipos de creación rápida disponibles en el Laboratorio de Desarrollo de Producto (LDP) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

Nuestro primer enfoque para la fabricación del dispositivo ha sido en base al diseño por fotolitografía UV. De esta manera, se pretendía conseguir el diseño de diferentes máscaras con la geometría deseada del dispositivo POC para el diagnóstico de infección urinaria (véase figura 3).

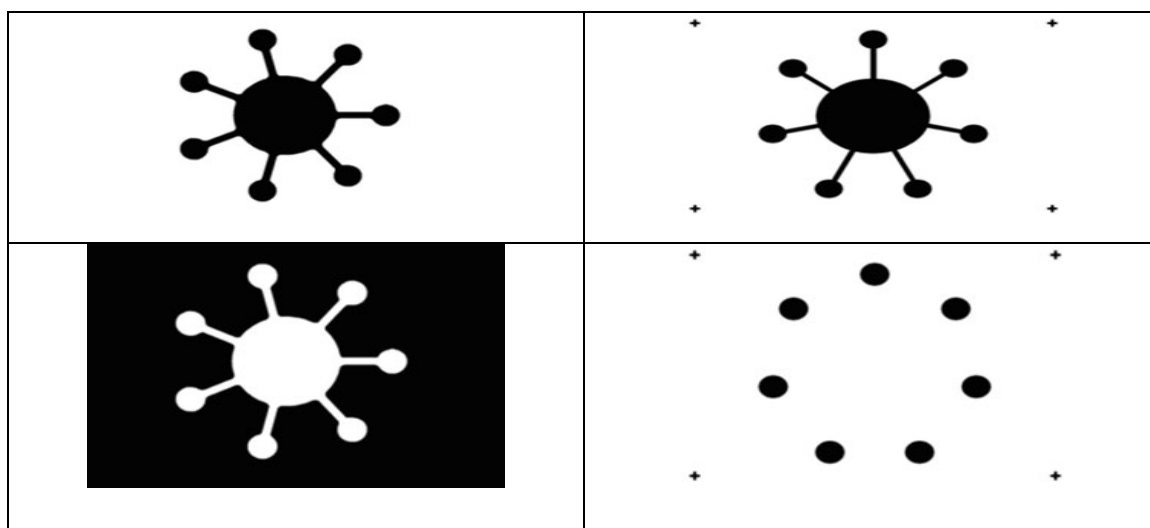


Figura 3. Máscaras para la fabricación de un microsistema biomédico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Máscara positiva y negativa para el uso de diferentes fotorresistencias (imágenes de la izquierda) y máscaras para dos pasos de micro-mecanizado dirigidas a la obtención de los picillos exteriores con una profundidad adicional (imágenes de la derecha).

La combinación de la fotolitografía UV y ataque químico, nos han permitido obtener placas metálicas con los microcanales del dispositivo. Además, mediante moldes de PDMS (polidimetilsiloxano) se pueden diseñar prototipos finales para su validación con muestras biológicas, antibióticos y sustancias cromogénicas.

El proceso de fabricación ha seguido la línea descrita por otros autores como De la Guerra et al., 2012, con algunas modificaciones. En resumen, se han utilizado placas de cobre y discos debido a su fácil procesabilidad y a la necesidad de trabajar con el ataque químico durante cortos espacios de tiempo. El uso del vidrio también es posible, pero el grabado con ácido fluorhídrico (HF) requiere un manejo especial. Para la fabricación de los microcanales hemos seguido varias etapas que incluyen:

- La preparación inicial de los discos de cobre mediante el lavado de los óxidos superficiales en el cubo de ultrasonidos durante 30 minutos y posterior secado.
- El recubrimiento de los discos usando fotoresina Dupont Risto PM-100.
- La exposición de la fotoresina a la luz UV por medio del equipo de SF-100 a partir de patrones micro-inteligentes LLC. Como se comentó anteriormente, este proceso es conocido como fotolitografía sin máscara, en donde el empleo de filtros de luz programables, evita el uso de máscara física.
- El uso de una solución de Na_2CO_3 al 0,85% para eliminar los restos de fotoresina en aquellas zonas que van a ser grabadas químicamente.
- El ataque químico introduce como sustrato una solución de FeCl_3 al 40% para atacar las zonas no revestidas, obteniendo así la micro-textura.
- Decapado o eliminación de la fotoresina restante.
- Lavado de los desechos y posterior secado.
- Verificación dimensional final.

Los procesos mencionados anteriormente son fáciles de industrializar. En nuestro caso, es importante destacar que el uso de dos máscaras (figura 3) y los procesos de fotolitografía UV y ataque químico, nos permiten obtener pocillos con una profundidad adicional, que es útil para la colocación de reactivos. La inclusión de cruces en las máscaras, resulta una práctica aconsejable para ayudarnos con los complejos procesos de alineación, siempre necesarios cuando el proceso de fabricación del micro-dispositivo se desarrolla en varias etapas.

Los principales resultados de esta propuesta de fabricación del dispositivo se muestran en la figura 3, figura 4 y figura 5. La figura 4 incluye los patrones metálicos fabricados

por fotolitografía UV y ataque químico, que pueden ser utilizados como partes finales o como moldes para la producción en masa de un micro sistema biomédico para el manejo de enfermedades a través del estampado en caliente o moldeo por micro-inyección. En la figura 5 se aprecia una vista detallada de un proceso de dos pasos con máscaras diferentes, que permite la fabricación de texturas con diferentes profundidades.

A pesar de tener la posibilidad de obtener detalles de 15-30 μm que puedan conducir las muestras biológicas a través de la acción capilar, la adición de una tapa para cerrar adecuadamente el sistema, requiere de una complejidad extra. Además, los resultados de los futuros prototipos están supeditados a otros factores más influyentes como las concentraciones de reactivos, tiempos de exposición, tiempo de grabados etc. Una vez ajustadas todas las variables, se trata de un proceso fácilmente industrializable.

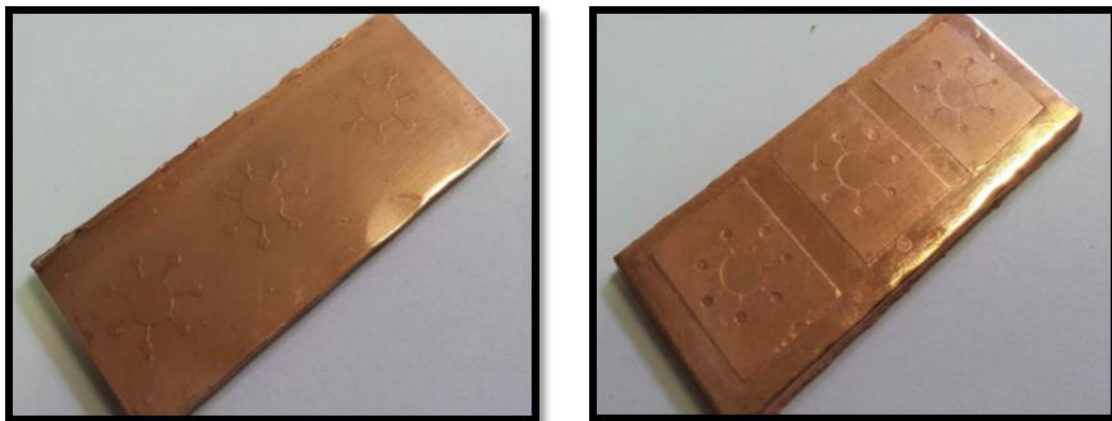


Figura 4. Patrones metálicos fabricados mediante fotolitografía UV y grabado químico.

Un enfoque alternativo, para vincular de forma más directa las geometrías diseñadas con los prototipos físicos, se basa en el diseño asistido por ordenador (CAD), las tecnologías de prototipado rápido basadas en procedimientos de fabricación aditiva y los procesos de herramientas rápidas para el desarrollo de piezas de bajo costo.

En este segundo enfoque, la fabricación se lleva a cabo directamente desde los archivos de diseño asistido por ordenador. Por medio de la estereolitografía láser (máquina SLA-3500 de 3D Systems) se trabaja en las distintas geometrías tridimensionales del dispositivo médico.

Dicha tecnología de fabricación aditiva es capaz de construir biodispositivos complejos, trabajando capa por capa, puede proporcionar uno de los mejores compromisos entre tamaño de pieza, precisión de fabricación y productividad entre todos los recursos de impresión 3D.

Se trata de un recurso importante en la fabricación de sistemas que trabajan con microfluidos, ya que permite la fabricación de dispositivos POC con canales internos en un proceso de un solo paso (Waldbaur et al., 2011).

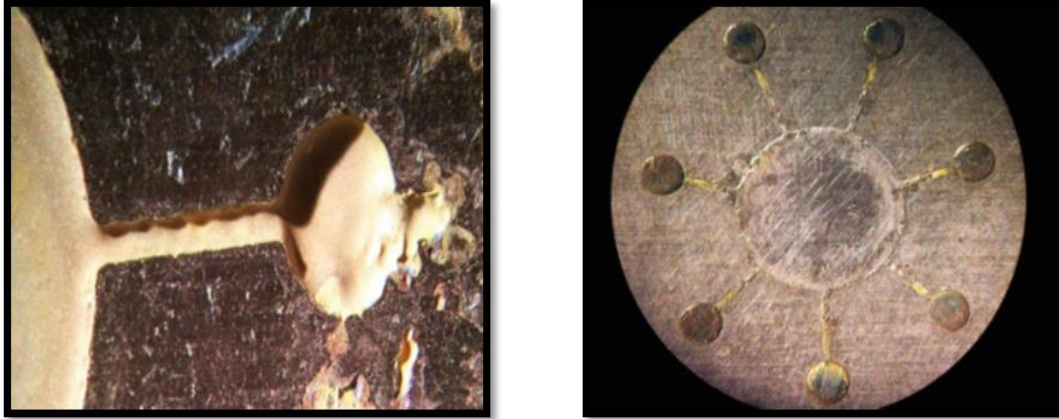


Figura 5. Patrones metálicos fabricados por fotolitografía UV y ataque químico, que se pueden utilizar ya sea como partes finales o como moldes para la producción en masa de un microsistema biomédico a través del estampado en caliente o microinyección. Detalle: El uso de un proceso de dos pasos con diferentes máscaras permite la micro-fabricación de texturas con diferentes profundidades.

La obtención de prototipos rápidos mediante estereolitografía láser se emplea habitualmente para validaciones estéticas y geométricas, con fines de marketing y para la fabricación de moldes de las futuras piezas finales. Sin embargo, su uso para ensayos funcionales es limitado.

La figura 6 muestra un prototipo rápido del dispositivo POC en fase de desarrollo. Los microcanales tienen la función de dirigir la muestra desde el pocillo central hacia los pocillos periféricos. La fabricación por medio de estereolitografía láser permite la producción monolítica de tales dispositivos con canales internos capaces de conducir las muestras por acción capilar.



Figura 6. Prototipos rápidos del dispositivo POC con canales internos capaces de conducir la muestra por capilaridad.

Como se puede observar en la figura 7, hasta 20 dispositivos se han fabricado utilizando solo una pequeña parte de la plataforma de construcción y utilizando un proceso que dura menos de 1 hora. Con algunas optimizaciones de diseño y una adecuada distribución de las piezas sobre la plataforma de construcción se pueden obtener más de 200 dispositivos/hora, utilizando diseños monolíticos y simplificando la producción en masa.

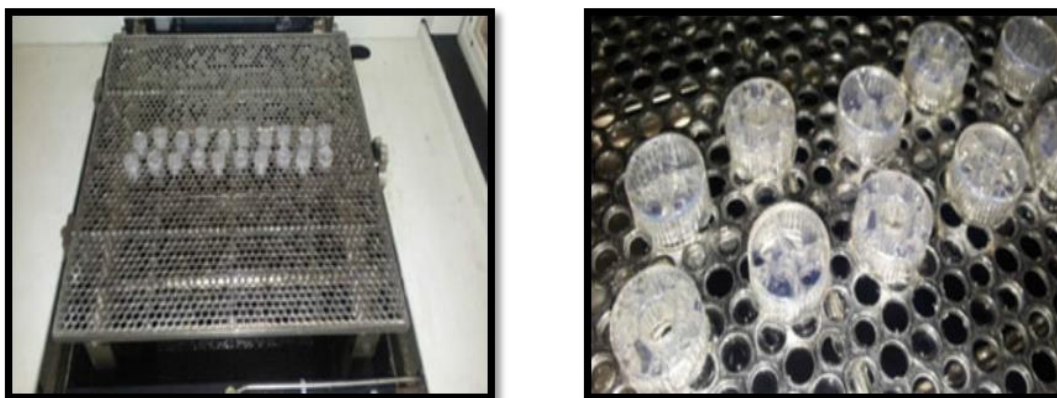


Figura 7. Dispositivos de diseño monolítico sobre la plataforma de construcción.

Esta metodología también es especialmente adecuada para la comparación de diseños alternativos, como la fabricación de geometrías completamente diferentes sin necesidad de cambiar la plataforma de construcción. En nuestro caso, ha sido importante para comparar la acción capilar de diferentes secciones del canal.

Los prototipos epoxi obtenidos por estereolitografía láser también pueden emplearse como moldes para la fundición de PDMS (polidimetilsiloxano) o como modelos maestros para la fabricación de moldes rápidos de PDMS para fundir otros polímeros con propiedades especiales, incluidas siliconas de grado biomédico, materiales más blandos o más duros, polímeros con transparencia mejorada o diferentes colores, entre otras posibilidades.

La figura 8 incluye diferentes ejemplos de moldes de PDMS y epoxi para obtener series más grandes del dispositivo. Para ello, se usa un diseño alternativo basado en dos capas. Es de gran importancia, el diseño geométrico de los canales para controlar la fluidez de la muestra biológica, ya que dependiendo de la hidrofobicidad de los polímeros pueden ser necesarias modificaciones del diseño y de los materiales a utilizar.

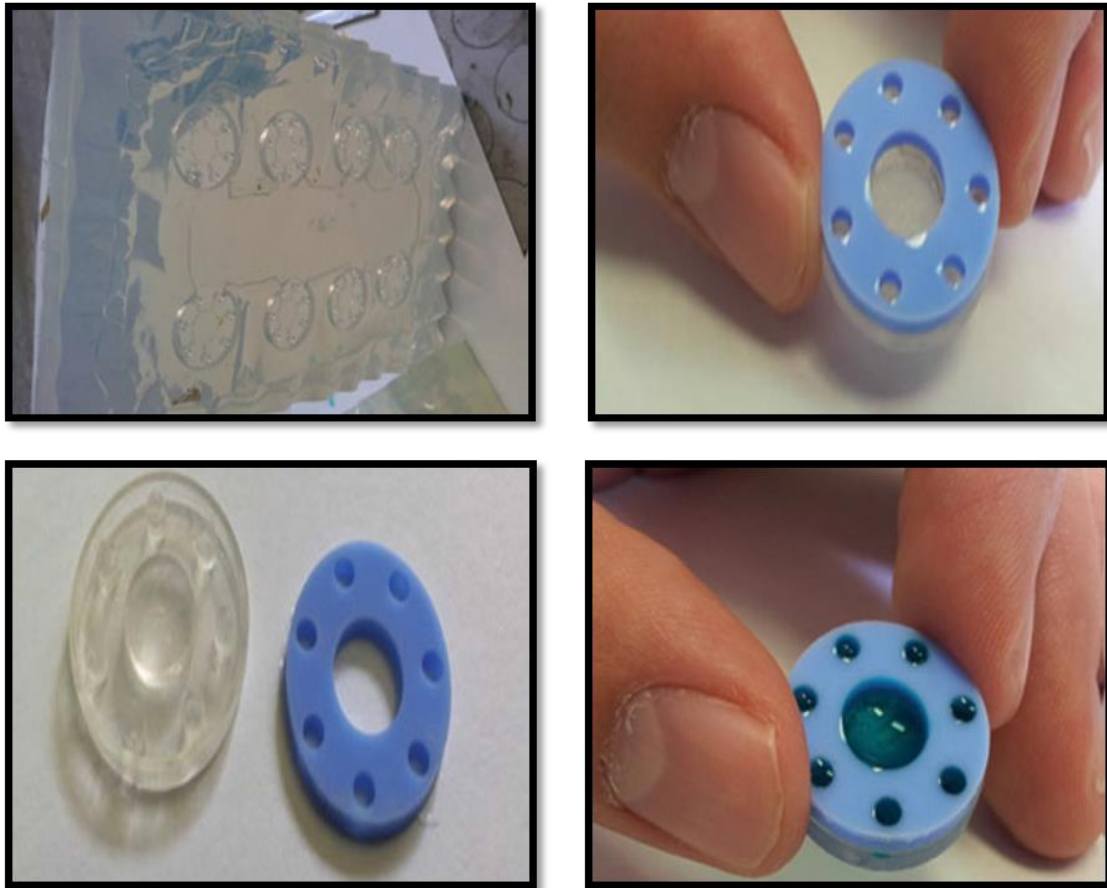


Figura 8. PDMS y moldes de epoxy para obtener series más grandes del dispositivo utilizando un diseño alternativo basado en dos capas.

En cuanto al diseño final del dispositivo, es importante valorar las ventajas y desventajas que puede proporcionar la acción capilar para impulsar la muestra biológica. Es cierto que la acción capilar simplifica la fabricación del dispositivo, ya que se evitan elementos de bombeo interno (jeringas, micro-bomba, etc.). Sin embargo, el diseño de las geometrías del canal debe cuidarse de forma minuciosa, con el fin de evitar rendimientos asimétricos.

➤ **Especificaciones del producto**

Dispositivo *Point of Care* (POC) que permite la determinación de la susceptibilidad antibiótica en el punto de atención del paciente con infección urinaria. El dispositivo debe contar con un pocillo control “C” como indicador de crecimiento bacteriano y 8 pocillos en los cuales se desarrolle el proceso microbiológico.

El dispositivo debe ser manufacturado en material plástico de grado médico, mediante inyección u otro, que asegure calidad, bajo costo y que el cambio de color sea de fácil visualización.

Los pocillos, deben llevar una lámina que asegure que no haya derrame de los reactivos y de la muestra de orina. Esta lámina debe permitir la impresión, por ejemplo, del número de serie del dispositivo para permitir la trazabilidad del mismo.

En base a los ensayos realizados, se pueden efectuar modificaciones del dispositivo para asegurar la eficiencia del mismo, siempre y cuando se mantenga el concepto de “*lab on a chip*” para diagnóstico en el punto de atención del paciente.

➤ Antecedentes

Etapa 1. Modelo 0

El punto de partida es el modelo conceptual propuesto en la etapa 1 del Proyecto, al cual se le denominó Modelo 0.

A continuación, se presentan cada una de las piezas que componen el diseño inicial del dispositivo POC (figura 9, figura 10, figura 11, figura 12). Se describe también su evolución hasta alcanzar el modelo utilizado para estimar el coste de su fabricación.

El Modelo 0 está constituido por dos piezas: La pieza superior, “Tapa”, y la pieza inferior llamada “Base”. La “Tapa” presenta un pocillo central y 7 pocillos periféricos. En la parte inferior de la “Tapa” se observa como el pocillo central comunica con los 7 pocillos periféricos mediante canales radiales. La “Base” contiene 7 pocillos periféricos. El concepto funcional de este modelo consiste en que la muestra de orina se deposita en el pocillo central y por capilaridad fluye por los canales hacia los pocillos periféricos.

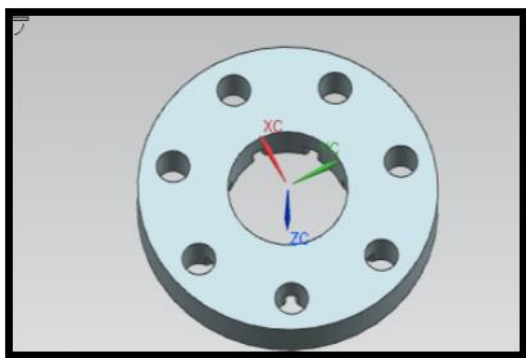


Figura 9. Tapa del Modelo 0 (vista superior).

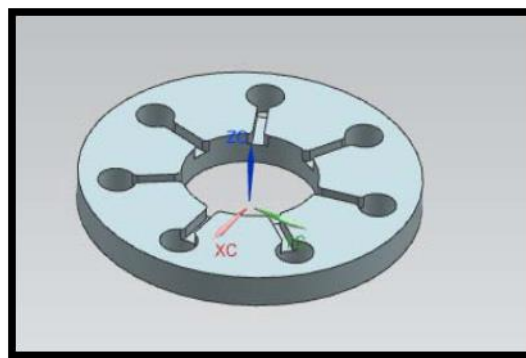


Figura 10. Tapa del Modelo 0 (vista inferior).

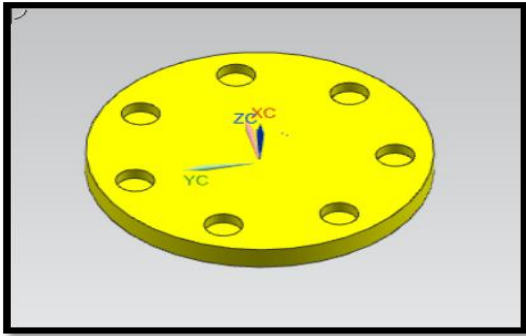


Figura 11. Base del Modelo 0.

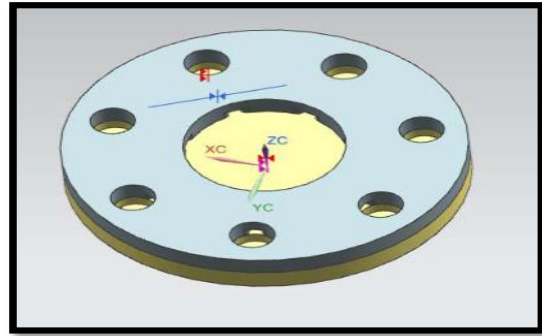


Figura 12. Conjunto ensamblado del Modelo 0.

La serie de prototipos que se desarrollaron en el LDP de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), mostraron que el efecto de la capilaridad que debía facilitar la llegada de la muestra desde el pocillo central, hacia los pocillos periféricos, era insuficiente.

Etapa 1. Modelo 1

Se decidió entonces que el llenado de los pocillos se realizara creando presión en la cámara central. Esta cámara debería ser cerrada, y la muestra introducida en la misma a presión por medio de una jeringa de plástico. El Modelo 1, que se muestra a continuación, recoge este concepto (figura 13, figura 14, figura 15, figura 16).

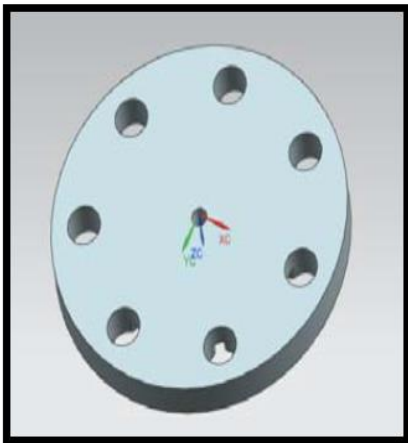


Figura 13. Tapa del Modelo 1 (vista superior).

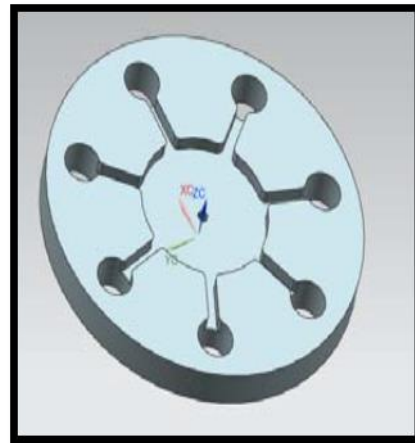


Figura 14. Tapa del Modelo 1 (vista inferior).

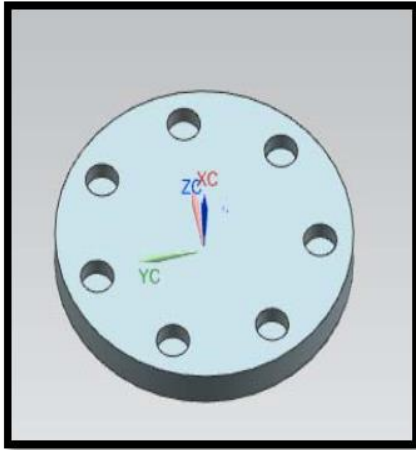


Figura 15. Base del Modelo 1.

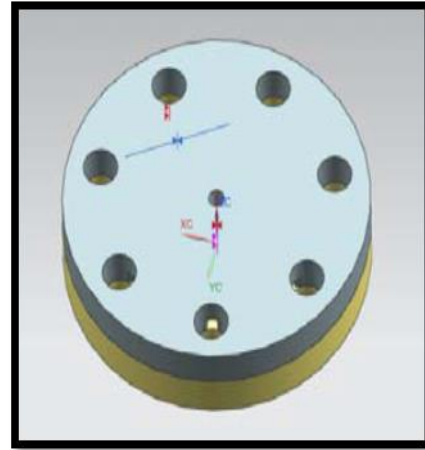


Figura 16. Conjunto ensamblado del Modelo 1.

Para asegurar que la muestra fluya por los canales, y no circule fuera de ellos, se decidió incorporar unos rebordes a los mismos. El concepto queda recogido en el Modelo 2, que se muestra a continuación (figura 17, figura 18).

Etapa 1. Modelo 2

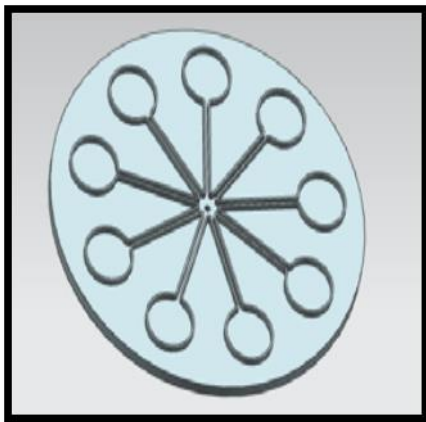


Figura 17. Tapa Modelo 2 (vista inferior).

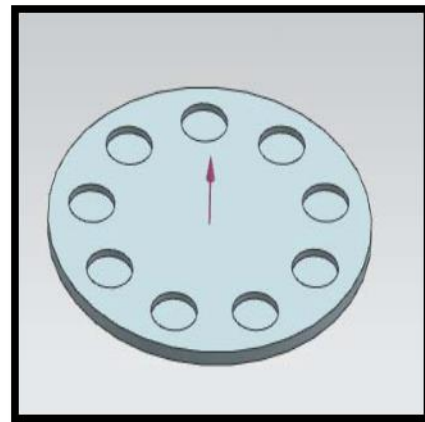


Figura 18. Base del Modelo 2.

Ambas piezas deben estar unidas a presión para que los canales dirijan la muestra hacia los pocillos y eviten el escape lateral de la misma. Para conseguirlo se optó por dotar a ambas piezas de detalles con superficies periféricas inclinadas. Al aplicar entre las piezas un giro relativo, las superficies inclinadas de las dos piezas toman contacto, y al forzar el giro relativo se provoca una unión entre ellas a presión por efecto cuña (figura 19). Esta idea queda recogida en el Modelo 3.

Etapa 1. Modelo 3

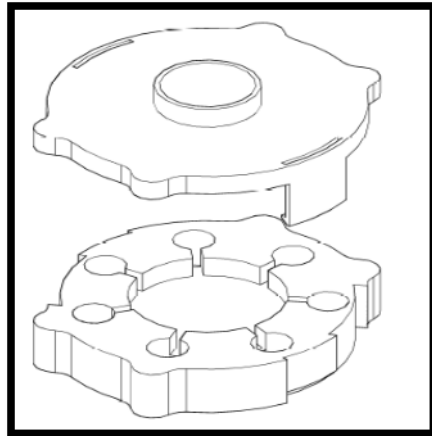


Figura 19. Conjunto de piezas que constituyen el Modelo 3 del dispositivo POC.

La unión de los modelos 2 y 3, constituye el modelo de partida de la etapa 2 del Proyecto.

Etapa 2

El modelo de partida está constituido por dos elementos: La “Tapa” y la “Base”. La “Tapa” tiene en su parte superior un orificio a través del cual, la boquilla de la jeringa introduce la muestra a presión. En la parte inferior hay una cámara central, de la que parten unos canales radiales y acaban desembocando en los pocillos periféricos.

La “Base” dispone también de pocillos periféricos. Ambos elementos, “Tapa” y “Base”, dispondrán de detalles con superficies inclinadas periféricas, de modo que, al aplicar un giro entre ellos, las superficies contacten y se origine su unión a presión por efecto cuña. En esta situación, los pocillos de la cara inferior de la “Tapa” coinciden en posición con los pocillos de la “Base”. Una vez introducida la muestra, se separan ambas partes aplicando un giro entre ellas de sentido inverso al aplicado para conseguir su unión. Tras retirar la “Tapa”, la “Base” puede ser recubierta por un film para su posterior manipulación.

Finalmente, se consultó a la empresa moldista (FERH) en relación a la fabricación del dispositivo POC-ITU. Esta empresa ofertó la realización de un único molde para la obtención de las dos piezas del dispositivo, por un precio de 400 € + IVA.

➤ **Desarrollo del dispositivo**

~ **Preámbulo**

El Equipo Investigador de la UPM pidió al Equipo Investigador del Hospital Universitario La Paz (HULP) una orientación sobre las dimensiones de los pocillos. Éste último propuso las dimensiones siguientes:

* Diámetros de los pocillos: entre 5 y 10 mm.

* Profundidad de los pocillos: 10 mm.

Asimismo, el Equipo Investigador del HULP indicó que los distintos antibióticos iban a ser introducidos en los respectivos pocillos en estado deshidratado, y que era necesario que, hasta el momento de la introducción de la muestra de orina, estos pocillos estuvieran cerrados herméticamente para evitar su evaporación.

También se indicó que, para minimizar el peligro de contaminación de la muestra, era necesario que su introducción en los pocillos fuera el resultado de una operación única. Es decir, que no era aconsejable que se introdujera la muestra en los pocillos en operaciones sucesivas.

Por otro lado, se valoró la posibilidad de que los pocillos permanecieran sellados herméticamente tras la inoculación de la muestra, ya que la cantidad de aire que quedaría remanente en ellos sería suficiente para el proceso microbiológico.

Atendiendo a estas propuestas, se consideró que el dispositivo a desarrollar debería estar constituido por dos elementos diferentes:

- *Elemento Receptor*

Este elemento contiene los 9 pocillos descritos en las especificaciones del producto. Dichos pocillos deben quedar cerrados herméticamente tanto después de la impregnación de los antibióticos, como después de la inoculación de la muestra de orina.

- *Elemento Dispensador*

Este elemento permite introducir la muestra en los 9 pocillos en una operación única.

~ Propuestas iniciales

- *Elemento Receptor*

Este elemento se propuso que estuviese constituido por tres piezas: La “Base”, la “Arandela” y la “Tapa”:

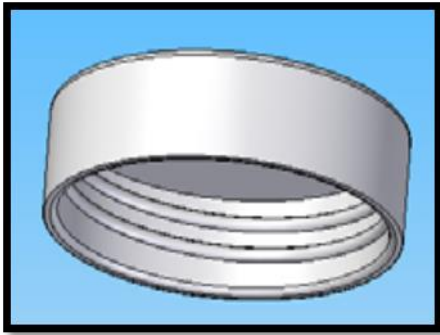


Figura 20. Tapa del elemento Receptor.

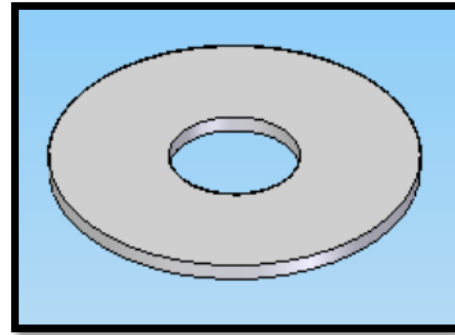


Figura 21. Arandela del elemento Receptor.

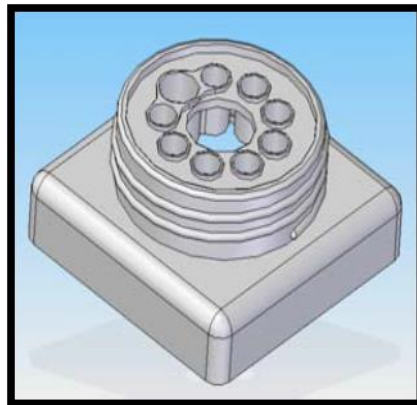


Figura 22. Base del elemento Receptor.

La “Tapa” y la “Base” disponen de superficies con rosca. La interposición de la “Arandela” entre ambos durante el enroscado asegura el cierre hermético de los pocillos.

- *Elemento Dispensador*

Como elemento Dispensador se propusieron dos prototipos:

- * Dispensador por canales.
- * Dispensador por pipeta múltiple circular.

○ *Dispensador por canales*

El Dispensador por canales está constituido por dos piezas, la pieza superior y la pieza inferior. La pieza superior tiene en su cara inferior unos canales abiertos cuyas paredes son superficies cónicas. La pieza inferior tiene en su cara superior unos canales abiertos que también tienen paredes constituidas por superficies cónicas (figura 25).

Para el guiado durante el ensamblado de las dos piezas, la pieza superior (figura 23) dispone de 4 agujeros periféricos en los que se introducen los 4 vástagos periféricos de la pieza inferior.

Por la unión a presión de las superficies cónicas de los canales de las dos piezas durante su ensamblado se obtiene el elemento Dispensador.

El Dispensador tiene en su parte superior un orificio cónico en el que se encaja la boquilla de la jeringa (figura 23). En su parte inferior, se encuentra el encaje para las 9 pipetas dispuesto circularmente (figura 24). El encaje de la pieza superior y la pieza inferior proporciona al Dispensador 9 canales que respectivamente comunican la cámara interior con las 9 pipetas (figura 26).

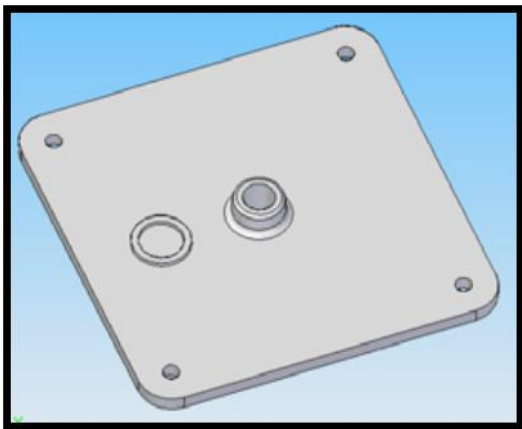


Figura 23. Cara superior de la pieza superior del dispensador por canales.

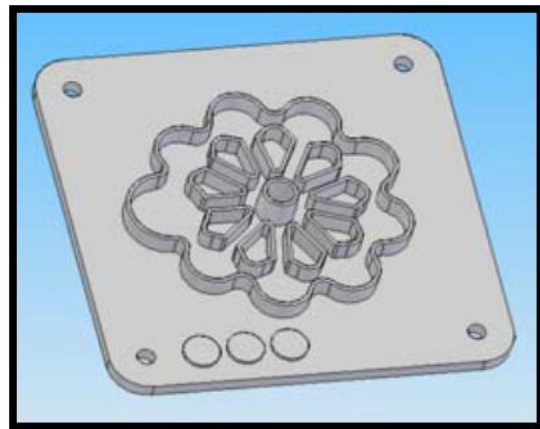


Figura 24. Cara inferior de la pieza superior del dispensador por canales.

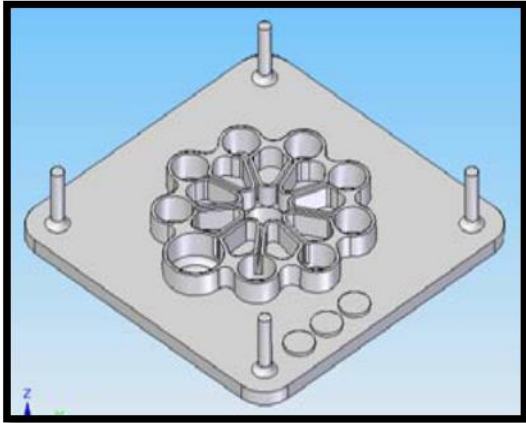


Figura 25. Cara superior de la pieza inferior del dispensador por canales.

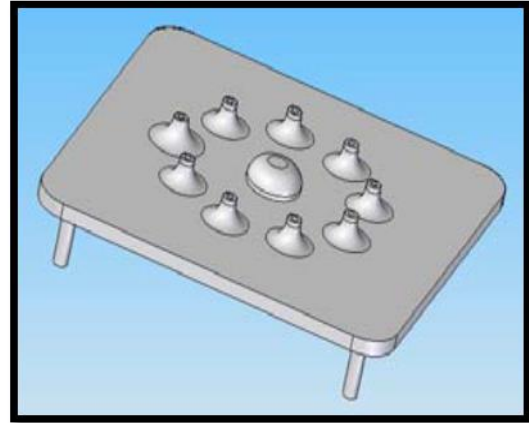


Figura 26. Cara inferior de la pieza inferior del dispensador por canales.

Proceso de dosificación de la muestra de orina en los pocillos:

- 1° Se posiciona el Dispensador sobre la base del Receptor.
- 2° Se carga la jeringa con la cantidad de muestra especificada.
- 3° Se aplica la boquilla de la jeringa en el orificio receptáculo del Dispensador.
- 4° Se presiona el émbolo de la jeringa para proceder a vaciar el contenido de la misma en los pocillos de la base del Receptor.

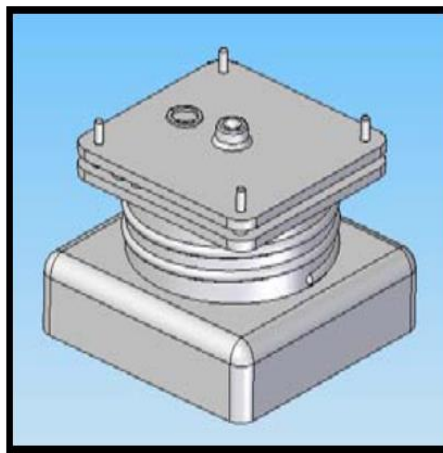


Figura 27. Elemento Dispensador por canales acoplado al elemento Receptor.

A continuación se retira el Dispensador, se dispone una Arandela limpia sobre el elemento Receptor y se cierra con la Tapa.

○ *Dispensador tipo pipeta múltiple circular*

El Dispensador tipo pipeta múltiple circular está constituido por dos piezas: la pieza superior y la pieza inferior. La pieza superior tiene una superficie interior cónica que se encaja a presión sobre una superficie exterior también cónica de la pieza inferior (figura 28, figura 29). El ensamblado a presión de las dos piezas conforma el elemento Dispensador (figura 30).

El Dispensador tiene en su parte superior un orificio cónico en el que se encaja la boquilla de la jeringa. En su parte inferior se encuentran las 9 pipetas dispuestas circularmente.

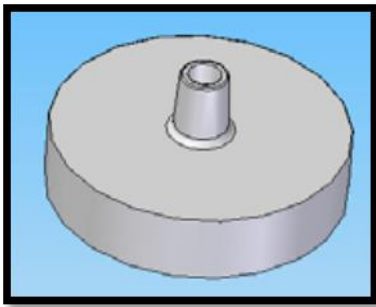


Figura 28. Pieza superior de la pipeta múltiple circular.

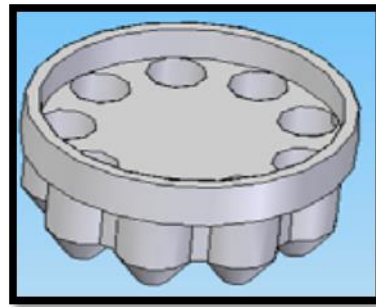


Figura 29. Pieza inferior de la pipeta múltiple circular.

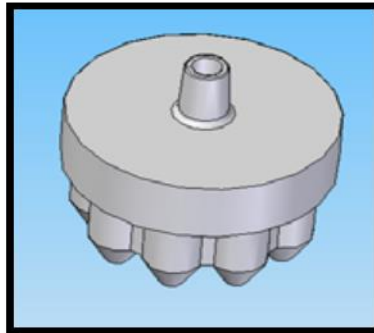


Figura 30. Elemento dispensador tipo pipeta múltiple circular obtenido por el encaje cónico de las dos piezas.

El Dispensador posicionado sobre el elemento Receptor quedaría de la siguiente manera:

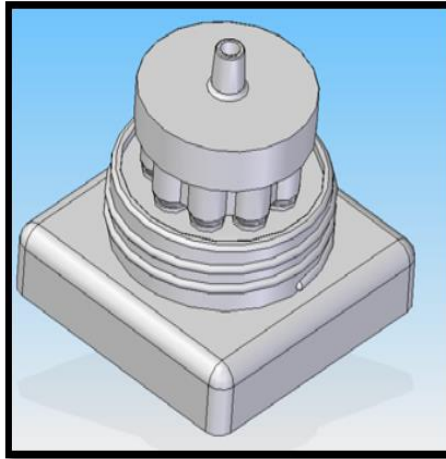


Figura 31. Elemento Dispensador tipo pipeta múltiple circular acoplado al elemento Receptor.

Proceso de dosificación de la muestra de orina en los pocillos:

- 1° Se encaja la boquilla de la jeringa en el agujero receptáculo del Dispensador.
- 2° Se introducen las pipetas del Dispensador en el frasco que contiene la muestra de orina y se succiona el máximo volumen que permite el émbolo.
- 3° Se saca el Dispensador del frasco que contiene la muestra de orina y se posiciona sobre la base del Receptor.
- 4° Se presiona sobre el émbolo de la jeringa para proceder a vaciar el contenido de las pipetas en los pocillos de la base del Receptor.
- 5° Se retira el Dispensador, se dispone una la Arandela sobre el Receptor y se cierra con la Tapa.

~ **Prototipos de los modelos propuestos**

En las imágenes que se muestran a continuación, se observan los primeros prototipos:

- *Dispensador por canales y elemento Receptor*



Figura 32. Piezas que constituyen el elemento Receptor (Base, Arandela, Tapa) del prototipo inicial del dispositivo POC.



Figura 33. Prototipo del elemento Receptor del dispositivo POC tras montaje de todas las piezas.



Figura 34. Piezas del Dispensador de tipo canal.



Figura 35. Montaje del Dispensador de tipo canal.

○ *Dispensador tipo pipeta múltiple circular*



Figura 36. Piezas del elemento Dispensador tipo pipeta múltiple circular.



Figura 37. Montaje del Dispensador tipo pipeta múltiple circular.



Figura 38. Conexión de la jeringa con el Dispensador del tipo pipeta múltiple circular.

~ Propuestas del modelo inicial del dispositivo POC-ITU

Con los resultados de los ensayos realizados en el LDP de la UPM con los prototipos de los modelos de dispositivo desarrollados, se llegó a las siguientes conclusiones:

- El elemento **Receptor** cumple con las especificaciones establecidas ya que es capaz de asegurar la estanqueidad de los pocillos en las dos fases del proceso:
 - Después de la impregnación de los antibióticos.

- Después de la inoculación de la muestra de orina.
- El elemento **Dispensador** del tipo pipeta múltiple circular proporciona un reparto de la muestra más equitativo entre los pocillos que el elemento Dispensador del tipo canales.

En consecuencia se propuso un dispositivo compuesto por:

- Elemento Receptor.
- Elemento Dispensador del tipo pipeta múltiple circular.

Se consultó a la empresa moldista FERH en relación a la fabricación del dispositivo propuesto. La empresa ofertó la realización de tres moldes para la obtención de las diferentes piezas:

- * Un molde para la Base. Coste 3.500 € + IVA.
- * Un molde para la Arandela y la Tapa. Coste 2.500 € + IVA.
- * Un molde para las dos piezas del Dispensador. 3.800 € + IVA.

Tras analizar todas las variables referentes a la fabricación del dispositivo POC-ITU para la detección de infección urinaria, se propusieron las siguientes consideraciones:

- El Grupo de trabajo del HULP indicó que sería conveniente que todos los pocillos tuvieran el mismo diámetro. Además, para distinguir los pocillos entre sí, se propuso grabar una numeración en el elemento Receptor.
- Los ingenieros de la UPM consideraron que para realizar el diseño definitivo era necesario definir el volumen de muestra a introducir en los pocillos.
- Los antibióticos quedarán impregnados en la base y paredes del pocillo. Por tanto, no es necesario asegurar la hermeticidad del Receptor mediante la Arandela, por lo que este elemento queda excluido. Se consideró conveniente la necesidad de que el Receptor tras el proceso de impregnación y secado de los antibióticos, quede cerrado para evitar la entrada de cualquier contaminante. Por ello, se estudió la posibilidad de unir la Tapa a la Base por encaje a presión.
- El Dispensador y el Receptor deben fabricarse en material transparente para facilitar la visualización de la entrada de la muestra de orina en los pocillos, así como, la lectura del antibiograma.
- En el embalaje de distribución del dispositivo se incluirá una hoja de papel con las instrucciones de uso y la tarjeta de registro de resultados (figura 39).



Figura 39. Modelo de tarjeta de registro de resultados del dispositivo POC-ITU e instrucciones de uso.

~ Propuesta del modelo final del dispositivo POC-ITU

El grupo de investigación de la UPM y del HULP, acordaron las siguientes modificaciones del dispositivo inicialmente propuesto:

- El elemento **Dispensador** del tipo pipeta múltiple circular, se mantendría como en la propuesta inicial.
- El elemento **Receptor** se adaptó a las siguientes recomendaciones:
 - a) Estaría constituido por dos piezas: la Base y la Tapa (Se eliminó la Arandela).
 - b) Se eliminarían las hendiduras para la rosca tanto en Base como en Tapa.
 - c) En la Base, los pocillos tendrían el mismo diámetro e irían enumerados.
 - d) Se redondearían dos esquinas de la Base, y se incluirían unas flechas en la cara superior de esta parte para que quede definida la posición de trabajo.
 - e) Las superficies cilíndricas de la Base y de la Tapa se deben convertir en superficies cónicas. El cierre de la Base por la Tapa se realizaría por unión a presión de estas dos superficies cónicas.

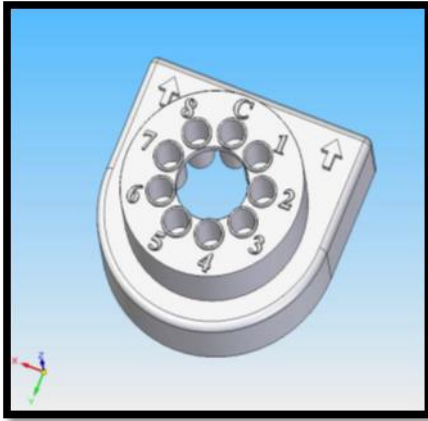


Figura 40. Elemento Receptor finalmente propuesto como parte del dispositivo POC.

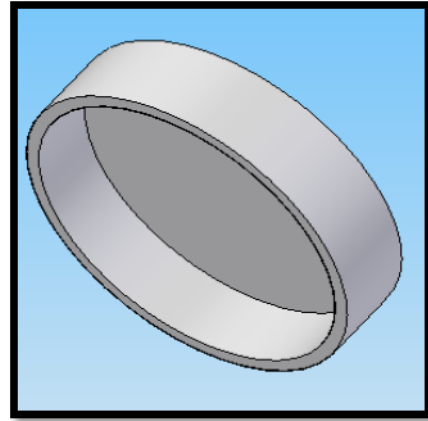


Figura 41. Tapa del elemento Receptor del dispositivo POC.

Tras la consulta a la empresa moldista FERH en relación a la fabricación del nuevo dispositivo propuesto. La empresa ofertó la realización de dos moldes para la obtención de las diferentes piezas:

- * Molde para la Base y la Tapa. Coste 3.500 € + IVA.
- * Molde para las dos piezas del Dispensador. Coste 3000 € + IVA.

La fabricación de más ejemplares tendría el coste de 1,5 € / dispositivo (constituido por 4 piezas).

Finalmente, tras valorar conjuntamente el aspecto estético, práctico y económico, de los prototipos mencionados anteriormente, se definió el prototipo que se describe a continuación, el cual satisface los requisitos de usabilidad y manufacturación a bajo costo, inicialmente deseados.

El prototipo se manufacturó en poliestireno cristal, mediante inyección y quedó constituido por dos elementos: el elemento Receptor y el elemento Dosificador.

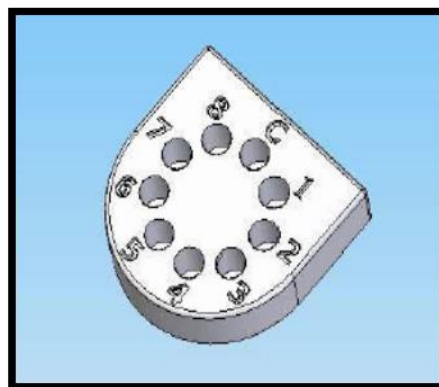


Figura 42. Elemento Receptor del dispositivo POC-ITU.

El elemento Receptor (figura 42), está constituido por una sola pieza y contiene 9 pocillos, en los cuales tendrá lugar el proceso microbiológico.

El elemento Dispensador, está constituido por un émbolo y dos piezas obtenidas por inyección, la pieza superior y la pieza inferior. La pieza superior del Dispensador contiene el cilindro que alberga el émbolo (figura 43), mientras que, la pieza inferior del Dispensador contiene las 9 pipetas para dispensar la orina (figura 44).

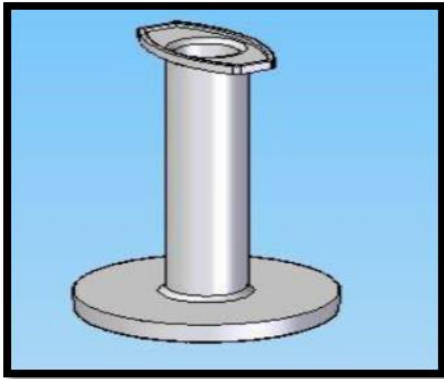


Figura 43. Pieza superior del Dispensador del dispositivo POC-ITU.

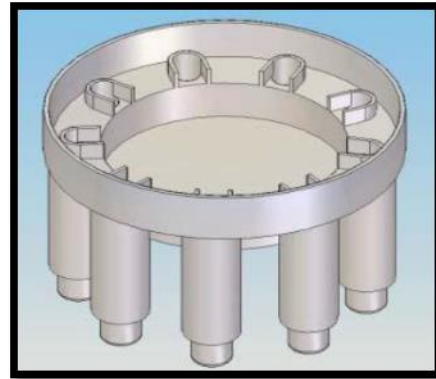


Figura 44. Pieza inferior del Dispensador del dispositivo POC-ITU.

Ambas piezas que componen el Dispensador, se encajan por el contacto a presión de dos superficies en cuña (figura 45).

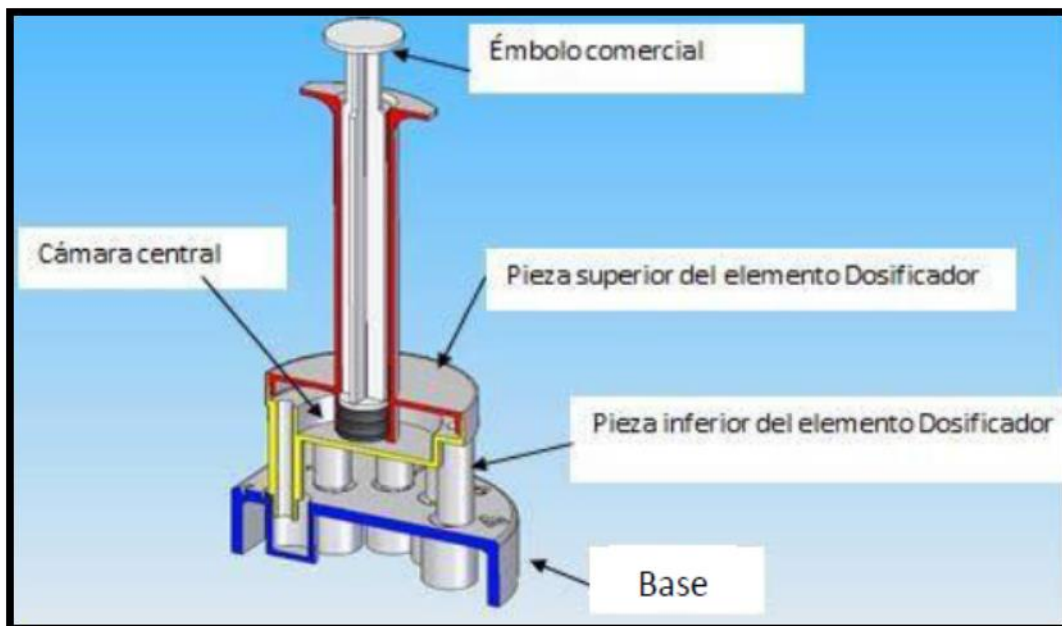


Figura 45. Modelo del prototipo definitivo del dispositivo POC-ITU para la detección de ITU y antibiograma rápido.

3.2.- GUÍA PARA LA INDUSTRIA Y LA FDA

Por medio del U.S. Departamento de Salud y Servicios Humanos, la *Food and Drug Administration* (FDA) y el Centro de Dispositivos y Salud Radiológica, se emitió el 28 de Agosto de 2009, la Guía para la Industria y la FDA donde se recogen las regulaciones a las que deben ser sometidos los dispositivos de detección de resistencias a los antimicrobianos.

La FDA es la agencia del Gobierno de los Estados Unidos (EE.UU.) responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos.

En las siguientes páginas se recogen los aspectos más destacados de esta guía usada por la FDA para asegurar la correcta validación y certificación de los dispositivos destinados a la detección de resistencias bacterianas *in vitro*.

Clase II. Controles Especiales. Documento Guía: Sistemas de prueba de sensibilidad a antimicrobianos (AST)

Un dispositivo AST se define como un “dispositivo que incorpora distintas concentraciones de agentes antimicrobianos para determinar la sensibilidad *in vitro* de distintos patógenos bacterianos aislados a partir de muestras clínicas”. El objetivo de estos dispositivos, es definir, en un lapso de tiempo no superior a 16 horas, el antibiótico de elección con el que instaurar un tratamiento dirigido.

Esta guía fue publicada en relación a una notificación del Registro Federal anunciando la reclasificación de los sistemas automatizados que emplean un período de incubación de menos de 16 horas (AST), asegurando una evaluación bien estandarizada, fiable y reproducible para este tipo de dispositivos.

La determinación de equivalencia con un dispositivo ya comercializado legalmente, se basa en el uso previsto, el diseño, los materiales, el rendimiento, la seguridad, la eficacia, el etiquetado y otras características aplicables. La FDA considera que la mejor manera de determinar el rendimiento de este tipo de dispositivos es compararlo con los métodos de referencia estándar del *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*, que históricamente son las pruebas de microdilución y difusión disco-placa.

Los métodos de referencia para la determinación del perfil de sensibilidad de un microorganismo, recomiendan 16-24 horas de incubación para bacterias aerobias y 48 horas para las bacterias anaerobias. Con tiempos de incubación más cortos se pueden proporcionar grandes ventajas clínicas. Por ello, un gran número de fabricantes han desarrollado procedimientos automatizados para la obtención de resultados en <16 horas. Los resultados de los métodos de referencia son el *gold estándar* para la evaluación de estos sistemas AST:

- Todos los métodos de referencia aceptados utilizan tiempos de incubación de 16 a 24 horas para bacterias aerobias.
- El conocimiento y la experiencia para la correlación de los resultados *in vitro* obtenidos en el laboratorio clínico con su eficacia clínica, se han basado en pruebas de incubación de 16 a 24 horas.
- Cuando hayan ocurrido discrepancias en la detección de resistencias por parte de un dispositivo AST, son el método de referencia para cotejar los resultados.

Por otro lado, la capacidad de un dispositivo AST para determinar si un microorganismo es sensible o resistente respecto al método de referencia es de gran importancia. Informar que un microorganismo es sensible a un determinado antibiótico, puede sugerir que una infección bacteriana no complicada pueda tratarse eficazmente con ese antibiótico. La incapacidad de un nuevo dispositivo para dar como sensible un microorganismo que es sensible a un agente antimicrobiano por el método de referencia se considera un "*error menor*". En este caso, si el nuevo dispositivo da un resultado como resistente para un microorganismo, el agente antimicrobiano no será seleccionado para su tratamiento cuando en realidad podría ser una opción efectiva. Tales errores pueden dar lugar a la utilización de agentes de amplio espectro e innecesariamente acentuar la presión para la selección de microbiota resistente.

Por el contrario, la incapacidad para detectar una resistencia a un determinado antimicrobiano, es considerada como "*error mayor*", ya que la terapia con ese agente antimicrobiano puede derivar en fracaso del tratamiento, sobre todo en infecciones graves. Una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de resistencias por parte del nuevo dispositivo, es de vital importancia para asegurar la eficacia clínica del tratamiento antimicrobiano y hacer un exhaustivo seguimiento de la aparición de resistencias en la comunidad.

El tiempo necesario para la expresión de resistencia varía en función del tipo de antimicrobiano que se esté testando. Además, cada microorganismo presenta distintos mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos. El retraso de la expresión de la resistencia puede variar de una a varias horas. Los estudios que comparan los resultados de sensibilidad antibiótica obtenidos mediante técnicas que trabajan con tiempos cortos de incubación frente a las técnicas que trabajan con tiempos de 16 a 24 horas, han documentado las dificultades que muestran las primeras, para la detección de resistencia retardada.

Los fabricantes de dispositivos con tiempos de incubación cortos han adoptado diversas estrategias para lograr resultados equivalentes a los métodos de referencia. Entre estas estrategias se incluyen:

- El uso de mayores concentraciones de bacterias en el inóculo.
- Ajuste de los medios de cultivo para optimizar la detección de resistencias.
- El uso de sofisticados dispositivos de lectura óptica asistidos por ordenador.

Diseño del estudio

En general, la FDA recomienda que las características de funcionamiento del nuevo dispositivo sean acordes al método de referencia estándar establecido por el *CLSI* para cada microorganismo y agente antimicrobiano sometido a ensayo.

Debido a las variaciones de reproducibilidad que puede haber en cada ensayo, se puede ver afectado el rendimiento del dispositivo, por lo que se recomienda que el fabricante, maneje distintas alternativas que permitan garantizar el correcto funcionamiento del mismo. Entre estas medidas se incluyen los métodos de preparación del inóculo bacteriano y de lectura de los resultados.

Además, se especifica la necesidad de tener un protocolo de ensayo que describa los procedimientos tanto para el método de referencia como para el nuevo dispositivo. El protocolo debe describir el diseño del estudio y especificar los controles de calidad recomendados. Los procedimientos deben incluir:

- Recomendación para la selección de microorganismos.
- Controles de calidad.
- Comprobación de la densidad y pureza del inóculo.
- Método de inoculación.
- Medios utilizados.

- Condiciones de incubación.

Por otro lado, la FDA considera que para el diseño del estudio, se debe incluir ensayos con diferentes métodos de inoculación y diluciones adicionales de la suspensión del microorganismo en estudio.

A. Método de referencia

Los pocillos deben contener al menos dos diluciones del agente antimicrobiano para el que se solicita la aprobación de la FDA. La selección de diluciones debe estar sujeta a las normas de la FDA y de interpretación del *CLSI* con una dilución dos veces por encima del umbral de resistencia y varias diluciones por debajo del umbral de sensibilidad, para proporcionar un rango de evaluación que permita detectar resistencias emergentes.

B. Nuevo dispositivo

Para un dispositivo capaz de cuantificar CMIs, debe incluir al menos cinco diluciones alrededor de los límites de sensibilidad y resistencia.

C. Selección de microorganismos

Se deben seleccionar los microorganismos para el estudio comparativo que estén dentro de las indicaciones clínicas del agente antimicrobiano y de su espectro de actividad según las normas de la FDA y del *CLSI*.

Una selección idónea de microorganismos, incluiría un 50% de microorganismos resistentes y un 50% de microorganismos sensibles. Se debe evitar el uso del mismo microorganismo aunque sea aislado de distintas muestras y evitar aquellos aislamientos obtenidos a menos de tres días de diferencia del mismo paciente. Los microorganismos con mecanismos de resistencia clínicamente significativos deben incluirse en el estudio, ya sean, microorganismos seleccionados del stock, de reciente aislamiento o microorganismos exigentes.

La FDA recomienda evitar testar microorganismos que no estén incluidos en el paquete de agentes antimicrobianos aprobado por dicha agencia, ya que no proporcionan información útil.

1. Microorganismos clínicos de reciente aislamiento

Se debe incluir en los ensayos, aquellos microorganismos que se hayan aislado de forma rutinaria en el laboratorio en los 7 días previos a la realización del test. También se debe incluir solo aquellos aislados para los cuales estén indicados los antibióticos a testar. Al mismo tiempo y en paralelo, se debe realizar el método de referencia respecto al nuevo dispositivo.

2. Stock de microorganismos clínicos

Generalmente, cada laboratorio tiene un stock de microorganismos de aislamiento poco frecuente. Estos microorganismos son guardados debido a sus patrones de crecimiento o resistencia única. Esta selección se puede utilizar para mejorar el grupo de microorganismos que van a ser testados con el nuevo dispositivo. No obstante, este grupo no debería comprender más del 50% de los microorganismos a testar. Se debe incluir estos aislamientos en el estudio cuando sea necesario incorporar una variedad más amplia de género y especie y también para aumentar el número de microorganismos resistentes a los antibióticos en estudio.

3. Microorganismos exigentes

Se recomienda seleccionar aquellos microorganismos exigentes enumerados en el paquete de agentes antimicrobianos aprobado por la FDA. Estos microorganismos deben estar dentro del espectro de actividad del agente antimicrobiano que se desea testar y puede tenerse acceso a ellos a través de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) o en un laboratorio de referencia que recoge y caracteriza las cepas, en base a sus patrones de resistencia o especial singularidad. Se puede añadir una selección de estos microorganismos si no han sido incluidos en las fases previas de validación del nuevo dispositivo.

Si los microorganismos se han caracterizado fenotípicamente con el método de referencia del *CLSI*, estos resultados de consenso se pueden definir como "*gold standard*". Si no se conoce el patrón de sensibilidad del microorganismo, se debe realizar el estudio de sensibilidad antibiótica mediante el método de referencia, antes de usar el microorganismo en la evaluación del dispositivo. Puede hacerse internamente o en un laboratorio externo. Sólo los resultados del método de referencia deben ser usados para determinar la validez de los resultados obtenidos con el nuevo dispositivo.

D. Control de calidad

La FDA recomienda llevar a cabo las siguientes pruebas de control de calidad, tanto para el método de referencia, como para el nuevo dispositivo:

- Recuentos del número de colonias en el inóculo de partida.
- Comprobar la pureza de todos los microorganismos.

En cuanto a la selección del rango de concentraciones de los antimicrobianos sometidos a ensayo, se debe incluir un mínimo de una dilución por debajo de la concentración que marca el punto de corte de sensibilidad de la bacteria, y una dilución por encima de la concentración mínima inhibitoria, a partir de la cual, la bacteria se considera resistente. Por ejemplo, si el rango esperado es 1-4 mg/l, la placa de referencia debe incluir 0,5-8 mg/l.

E. Comprobación de la densidad del inóculo

El objetivo de la verificación de la densidad del inóculo es asegurar que la concentración de ensayo final de un microorganismo dará lugar a la concentración recomendada en los pocillos del nuevo dispositivo. Algunos agentes antimicrobianos se ven afectados por la variabilidad del inóculo final y el rendimiento del dispositivo puede verse comprometido. Por ello, se debe realizar el recuento de colonias tal y como recomiendan los protocolos del *CLSI*, acerca de los métodos de preparación del inóculo. Idealmente, esto debería incluir a todos los aislamientos usados como control de calidad, los aislamientos para las pruebas de reproducibilidad y el 10% de los aislamientos clínicos.

Por otro lado, en el ensayo de dilución en caldo, se debe realizar el recuento de colonias directamente desde el panel inoculado para asegurar que el período de tiempo transcurrido entre el ajuste del inóculo inicial y la inoculación no ha afectado negativamente a la densidad de inóculo. Para un dispositivo que no utilice caldo, se debe realizar una determinación del recuento de colonias inmediatamente antes de la realización de la prueba.

Puede haber distintos criterios para estandarizar el inóculo bacteriano en función del tipo de dispositivo. En caso de un dispositivo espectrofotométrico, éste debe proporcionar la suficiente información para demostrar que el estudio del recuento de colonias descrito anteriormente no es necesario. Sin embargo, si se utiliza un método no espectrofotométrico, es necesario proporcionar la información adecuada para demostrar que el inóculo está en el rango esperado. El estudio debe demostrar que el inóculo para la cepa *ATCC 25922 Escherichia coli* está en el rango esperado de $3-7 \times 10^5$ ufc/ml. Además, se debe demostrar que la metodología de preparación del inóculo del nuevo dispositivo, proporciona el mismo rango que el del método de referencia.

F. Comprobación de la pureza

La comprobación de la pureza es necesaria para los procedimientos de dilución en caldo, con el fin de detectar cultivos mixtos que puedan causar resultados erróneos. Tal y como se recomienda en el protocolo CLSI-M7, se debe realizar esta comprobación después de la inoculación del dispositivo. Por ello, se deben realizar siembras de control de pureza para todos los inóculos utilizados tanto para el método de referencia como el nuevo dispositivo.

G. Reproducibilidad

Se recomienda testar un mínimo de 25 microorganismos con resultados conocidos para el agente antimicrobiano indicado. Estos pueden ser los microorganismos exigentes u otros microorganismos con patrones de sensibilidad y resistencia conocidos. Se recomienda la identificación de los microorganismos y su envío a 3 laboratorios distintos para ser testados con el nuevo dispositivo. Dado que este tipo de estudio no producirá variabilidad dentro de cada laboratorio, deberá proporcionar los datos necesarios que demuestren la reproducibilidad del dispositivo.

Una evaluación alternativa de reproducibilidad se puede llevar a cabo utilizando 10 microorganismos con un patrón de sensibilidad y resistencia conocido. Deben ser testados en cada laboratorio en tres días alternos y por triplicado, con un inóculo preparado de forma diferente para cada prueba (27 resultados por aislamiento). El uso de este diseño de estudio, permite calcular la reproducibilidad tanto a nivel intra- como inter-laboratorio.

Presentación de datos

La FDA recomienda que se proporcione un resumen de los resultados de rendimiento, reproducibilidad y control de calidad del nuevo dispositivo en estudio.

Para la presentación de los resultados obtenidos en la evaluación del nuevo dispositivo, esta guía recomienda lo siguiente:

1. Microorganismos de stock y de aislamiento reciente:

Se recomienda presentar una lista de los microorganismos testados por cada laboratorio, en donde se recoja el número de microorganismos, así como, una identificación a nivel de género y especie. Otra lista para los microorganismos que han mostrado discrepancia de resultados entre el método de referencia y el nuevo dispositivo, incluyendo el género y especie, laboratorio donde ha tenido lugar la discrepancia, resultado del método de referencia y resultado del dispositivo a estudio, tipo de error cometido, el método de inoculación y de lectura.

2. Microorganismos exigentes:

En este caso, se deben presentar los resultados de los microorganismos exigentes que se hayan testado, comparándolos con los resultados obtenidos por medio del método de referencia.

Así mismo, es necesario presentar la metodología del método de inoculación y de lectura por separado.

Se recomienda presentar un listado de todas las discrepancias, incluyendo el nombre del microorganismo, laboratorio donde ha tenido lugar la discrepancia, resultado del

método de referencia y del dispositivo en estudio, tipo de error y metodología de inoculación y lectura empleada.

3. Control de calidad:

Según la FDA, para la presentación de los resultados del control de calidad, se recomienda un tamaño muestral de al menos 20 aislamientos por laboratorio y por cada método de inoculación y lectura incluida en el prospecto del nuevo dispositivo. Además, se aconseja la presentación de todas aquellas medidas que sean necesarias adoptar en caso de que los resultados estén fuera del rango esperado.

4. Reproducibilidad:

Se deben presentar los datos de reproducibilidad para todos los procedimientos, así como, un resumen de los estudios internos que demuestren la variabilidad existente en los resultados de varios test efectuados sobre el mismo aislamiento.

Evaluación de resultados

La guía de la FDA proporciona una serie de recomendaciones para la evaluación de los resultados del estudio. El control de calidad y los resultados de reproducibilidad también deben tenerse en cuenta al evaluar el rendimiento entre el método de referencia y el nuevo dispositivo.

1. Microorganismos de reciente aislamiento, stock y microorganismos exigentes:

Independientemente de cómo se presenten los resultados, se debe incluir sólo aquellos microorganismos que han sido testados con regularidad para el agente antimicrobiano en estudio.

Se aconseja utilizar tablas para presentar los resultados referentes a los criterios de interpretación del agente antimicrobiano y las concentraciones ensayadas tanto en el método de referencia como el del nuevo dispositivo.

Se debe prestar especial atención a los microorganismos con significación clínica y que están dentro del espectro de actividad del agente antimicrobiano en estudio. Si los

resultados obtenidos para los microorganismos enumerados en la lista aprobada por la FDA, respecto al agente antimicrobiano que figura en el etiquetado, están por debajo de lo esperado, se recomienda que se añada una *declaración de limitación* y considerar la realización de un estudio futuro para conseguir un rendimiento aceptable. Este tipo de *declaración de limitación* no es necesaria para los microorganismos para el que el agente antimicrobiano no tiene utilidad clínica o no ha sido aprobado para su uso por la FDA (ej. cefdinir con *Enterococcus spp.* y *Pseudomonas spp.*).

2. Control de calidad:

Los resultados del ensayo del nuevo dispositivo con las cepas usadas como control de calidad deben estar dentro del intervalo de confianza del 95% (IC95%). En determinadas ocasiones, el resultado esperado del nuevo dispositivo podría no coincidir con los rangos propuestos por el *CLSI* para un agente antimicrobiano. En este caso, se debe presentar datos adicionales según las recomendaciones del CLSI-M23 ("Criterios de desarrollo *in vitro* de pruebas de sensibilidad y parámetros de control de calidad").

Estos datos deben demostrar la reproducibilidad en el nuevo rango presentado, además de avalar que todos los parámetros del método de ensayo son correctos. Entre estos parámetros de control de calidad, se puede incluir la verificación de la densidad del inóculo.

Por otro lado, los resultados del control de calidad que con frecuencia están fuera del rango recomendado, también requieren un examen más detenido para determinar si hay una tendencia similar que podrían afectar los resultados clínicos.

3. Reproducibilidad:

En caso de que exista alguna discrepancia en la reproducibilidad de la metodología llevada a cabo por cada laboratorio, debe incluirse una *declaración de limitación* en la que se indique a los usuarios de cómo deben informar dichos resultados.

3.3.- CÁLCULO DEL INÓCULO BACTERIANO DEL DISPOSITIVO POC-ITU

Para determinar el inóculo bacteriano que debe albergar cada pocillo del dispositivo POC, se realizaron ensayos con las siguientes cepas de referencia del laboratorio:

- *Escherichia coli* CECT 434 (ATTC 25922, Migula 1895).

Este microorganismo (serotipo O6; biotipo 1) es una cepa de control del *CLSI* para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Sus condiciones óptimas de crecimiento son a 37°C en atmósfera aerobia. Es usado habitualmente como cepa de control negativo para la producción de la toxina termolábil de *E.coli* y la verotoxina. Es sensible a amoxicilina/ácido clavulánico y se usa como cepa de control de calidad de distintos sistemas automatizados de determinación de sensibilidad antibiótica como Vitek-2 (Biomérieux®) y MicroScan (Beckman-Coulter®).

- *Klebsiela oxytoca* CECT 8207 (WDCM00096, Flügge 1886).

Este microorganismo es una cepa de control recomendada para ser usada en UNE-CEN ISO/TS 11133 (*Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivos*). Sus condiciones óptimas de crecimiento son a 30°C en atmósfera aerobia. Se trata de una cepa resistente a amoxicilina/ácido clavulánico.

Para ello, se trabajó con inóculos cuantificables obtenidos a partir de la reconstitución de los crioviales que contienen las cepas de referencia. Los anillos de los crioviales se reconstituyeron en tubos con agua de peptona tamponada y se incubaron a 37°C ± 1°C, durante 24 horas ± 2h.

A continuación, se sembraron por aislamiento en una placa de agar sangre (TSA, Biomérieux®) y se volvieron a incubar a 37°C ± 1°C, durante 24 horas ± 2h.

A partir de la placa de TSA, se tomó una colonia con el asa de siembra y se sembró en un tubo con 10 ml de agua de peptona. Se incubó 18 horas ± 1h a 37°C ± 1°C, con el fin de trabajar con el microorganismo en fase estacionaria de crecimiento.

Tras la incubación, se prepararon diluciones decimales en agua de peptona y se realizaron siembras de 0,1 ml en cinco placas de medio de cultivo TSA (figura 46).

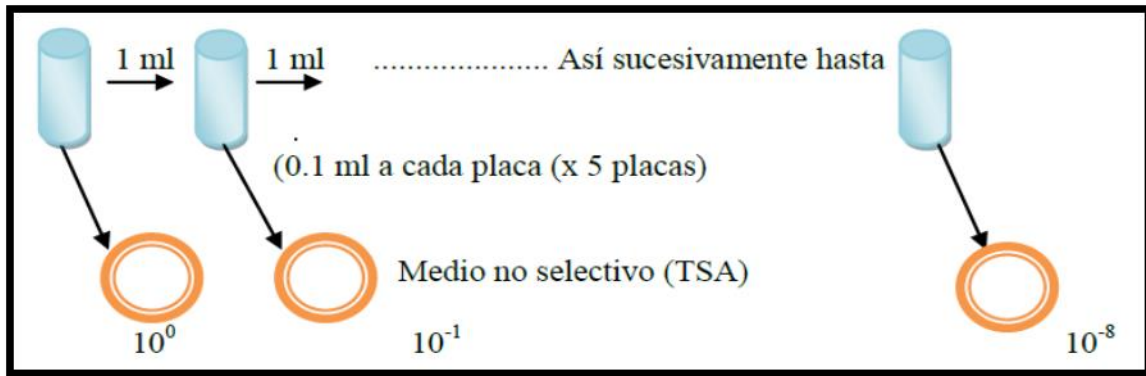


Figura 46. Esquema de la siembra en TSA de las diluciones decimales de las cepas de referencia tras su incubación en agua de peptona.

Se procesaron de 8 a 10 diluciones de la cepa de referencia y se buscó el recuento que permitiese obtener el inóculo deseado. Para ello, se examinó la serie de diluciones en las placas de TSA que tuviesen un recuento entre 10 y 300 colonias y se hizo la media aritmética de las cinco placas. Se realizó también la media aritmética de las cinco placas de la siguiente dilución.

El número de microorganismos considerado como valor asignado al inóculo (N) se calculó como la media corregida de dos diluciones sucesivas, utilizando la ecuación:

$$N = \Sigma C / V \cdot n_1 \cdot d \rightarrow N = \Sigma C / 0,1 \cdot 5 \cdot d$$

ΣC : Suma de las unidades formadoras de colonias (ufc) contadas en las dos placas de diluciones sucesivas.

V : Relación de volumen inoculado en mililitros en cada placa.

n_1 : Número de placas sembradas de cada dilución del recuento.

d : Dilución correspondiente a la primera dilución escogida.

Para obtener el inóculo correspondiente a diluciones mayores o menores, se debe multiplicar o dividir por diez tantas veces como órdenes de dilución se aumente o disminuya.

Según la *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (SEIMC) y la guía *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)*, el inóculo de partida recomendado para los métodos de dilución en caldo es el correspondiente a la suspensión de 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml) (CLSI 2012; García Rodríguez et al., 2000).

La SEIMC, en estudios de sensibilidad a antimicrobianos por microdilución, aconseja la utilización de un inóculo final de 5×10^5 ufc/ml (Se acepta de 3 a 7×10^5 ufc/ml) o 5×10^4 ufc/pocillo (García Rodríguez et al., 2000).

Por lo tanto, la suspensión inicial a 0,5 McFarland, debe diluirse con el mismo caldo de medio de cultivo empleado para la prueba de manera estandarizada.

Según nuestra experiencia con las pruebas realizadas en el laboratorio, esta turbidez corresponde a una concentración de microorganismo del orden de 10^8 ufc/ml, y se consigue con la dilución 10^{-1} (1/10) de la cepa reconstituida y estandarizada de la forma descrita anteriormente, tras llegar a la fase estacionaria de crecimiento (para la mayoría de microorganismos no exigentes).

Para la inoculación de las placas ELISA impregnadas se hicieron diluciones decimales de la dilución patrón a 0,5 McFarland de la cepa de trabajo en agua destilada, ya que el inóculo empleado sirve como medio de reconstitución del medio de cultivo y como vehículo del microorganismo en estudio.

Según los resultados previstos dado el rendimiento habitual de las cepas en el laboratorio, para poder inocular la cantidad recomendada ($5,0 \times 10^4$ ufc/pocillo) habrían dos opciones:

- 1ª.- Tomar 5 μ l de la dilución de la cepa correspondiente a 10^{-2} (1/100) y añadir 145 μ l de agua destilada estéril.
- 2ª.- Tomar 150 μ l de una dilución de la cepa 1/2 de 10^{-3} .

Se utilizó la segunda opción dado que el volumen crítico tomado con los sistemas de pipeteo existentes en el laboratorio, ofrece mayor robustez y precisión.

Además del inóculo recomendado por la SEIMC, se ensayaron otros inóculos de partida, y se sembraron de forma paralela en TSA con el fin de comprobar que la pureza y la carga bacteriana introducida en el pocillo, era la deseada.

El valor de estos inóculos, se obtienen a partir del rendimiento cuantificado de la cepa en fase estacionaria de crecimiento.

Los inóculos ensayados en las distintas columnas de la placa ELISA con las cepas de referencia del laboratorio se muestran en la siguiente tabla:

Número de columnas	Dilución	ufc/pocillo
Columna 1	$1/2 \cdot 10^{-3}$	Aprox. $5,0 \times 10^4$
Columna 2	$1/3 \cdot 10^{-3}$	Aprox. $3,5 \times 10^4$
Columna 3	$1/4 \cdot 10^{-3}$	Aprox. $2,5 \times 10^4$
Columna 4	$1/5 \cdot 10^{-3}$	Aprox. $2,0 \times 10^4$
Columna 5	10^{-1} (0,5 McFarland)	Aprox. $1,5 \times 10^8$
Columna 6	$1/2 \cdot 10^{-3}$ (Sin antibiótico)	Aprox. $5,0 \times 10^4$

Tabla 2. Distribución en placa ELISA de los distintos inóculos y su correspondiente dilución, para el cálculo del inóculo de trabajo del dispositivo POC-ITU.

Cálculo del inóculo bacteriano a partir de muestras de orina

Teniendo en cuenta las especificaciones del dispositivo POC, de detectar bacteriuria significativa y resistencias bacterianas a partir de muestras directas de orina, se realizó un ensayo para determinar qué procesamiento previo hay que realizar sobre la muestra de orina, con el fin de obtener el inóculo bacteriano deseado en los distintos pocillos del dispositivo.

Para ello, las muestras de orina se sembraron por recuento mediante asa de siembra calibrada de 1 μ l en medio cromogénico (Becton-Dickinson®) y se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 18-24 horas. Una vez sembradas las muestras, éstas se conservaron en nevera a 4°C durante 18 horas. Tras la valoración del urinocultivo, se recuperaron aquellas muestras de orina con resultado positivo ($>10^5$ ufc/ml).

A continuación, se realizaron las siguientes diluciones en suero fisiológico estéril de cada una de las muestras de orina seleccionadas: 1/10, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/500.

Posteriormente, se pipetearon 150 μ l de cada una de las diluciones y se inocularon en distintos pocillos de una placa ELISA estéril. Finalmente, se tomó 1 μ l con asa de siembra calibrada de las distintas diluciones de la muestra de orina contenidas en los pocillos de la placa ELISA, y se sembró por recuento en un medio no selectivo TSA.

La dilución de la muestra de orina que proporcionase un recuento en placa de aproximadamente 300 ufc (aprox. 5×10^4 ufc/pocillo), definiría la dilución que habría que realizar sobre la muestra de orina del paciente, antes de su inoculación en el dispositivo POC.

3.4.- IMPREGNACIÓN DEL DISPOSITIVO

3.4.1.- Proceso de impregnación estándar

La impregnación se define como el proceso mediante el cual se van a rellenar los pocillos del dispositivo POC con una solución que contiene los reactivos adecuados para favorecer y revelar el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se someterá el dispositivo a un proceso de secado, de modo que, el fondo y las paredes de los pocillos queden impregnados de un sedimento reconstituible (figura 47).

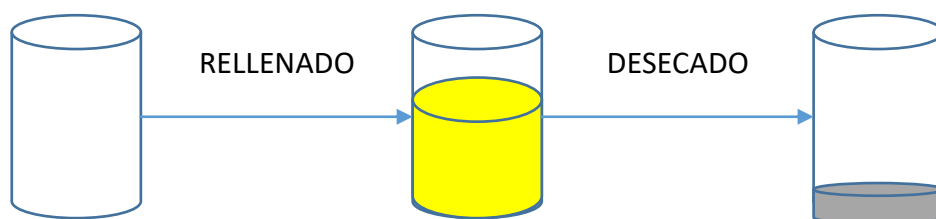


Figura 47. Esquema del proceso de impregnación de los pocillos del dispositivo POC.

El objetivo de esta parte del estudio fue establecer qué condiciones son las más idóneas para impregnar los pocillos del dispositivo POC, de manera que, se obtengan los resultados previstos acordes a lo indicado en referencias comúnmente aceptadas como por ejemplo, la Guía *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Soportes para la impregnación

Dependiendo de la finalidad, los soportes utilizados para la impregnación fueron:

- a) Dispositivo POC: el diseño del prototipo del dispositivo POC-ITU definitivo es el que se ha utilizado para impregnar los pocillos para su posterior validación clínica. Se trabajó con el elemento receptor de 9 pocillos (figura 48). Se agregó a los pocillos el medio de cultivo y los antibióticos correspondientes, así como, el reactivo revelador de crecimiento bacteriano.



Figura 48. Receptor del dispositivo POC-ITU.

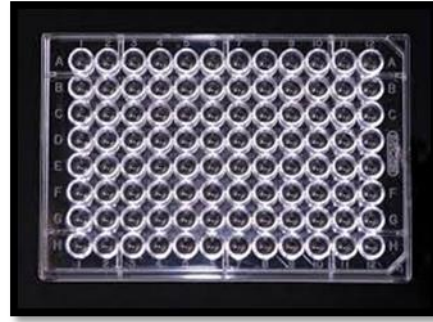


Figura 49. Placa ELISA estéril.

b) Placas ELISA estériles: este tipo de soporte, emulando al dispositivo POC (figura 49), es el que se utilizó para la realización de pruebas de mejora del dispositivo, como por ejemplo, evaluación de las condiciones de desecación, ensayo de antibióticos, cálculo del inóculo bacteriano etc.

Procedimiento de impregnación estándar

Siguiendo la línea de fases anteriores del Proyecto, se inocularon todos los pocillos con 150 μ l del caldo de cultivo conteniendo el indicador de crecimiento bacteriano (violeta de tetrazolio; VT). Debido a la necesidad de testar los medios de cultivo Brain Heart infusión (BHI) y Mueller-Hinton (MH), se trabajó con placas ELISA fraccionadas, de manera que los pocillos correspondientes a las columnas 1-6 albergaran la solución BHI-VT y la otra mitad de la placa (columnas 7-12) la solución de MH-VT (figura 50).

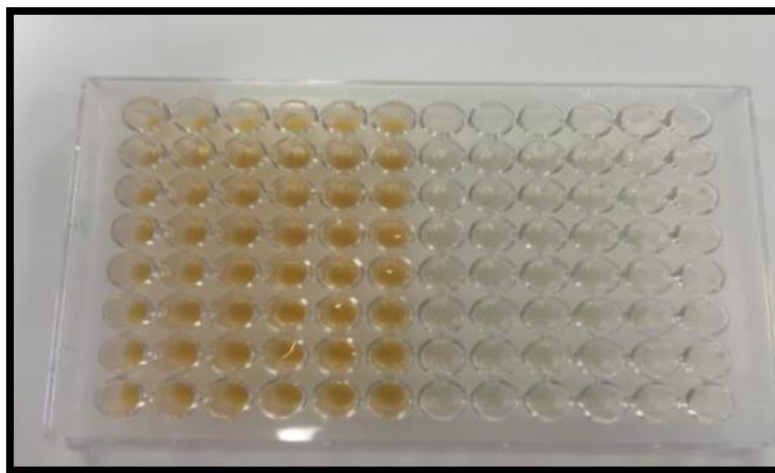


Figura 50. Placa ELISA con BHI-VT (columna 1-6) y MH-VT (columna 7-12) antes del proceso de desecación.

A continuación, se inoculan los pocillos con el antibiótico correspondiente, siguiendo el siguiente esquema:

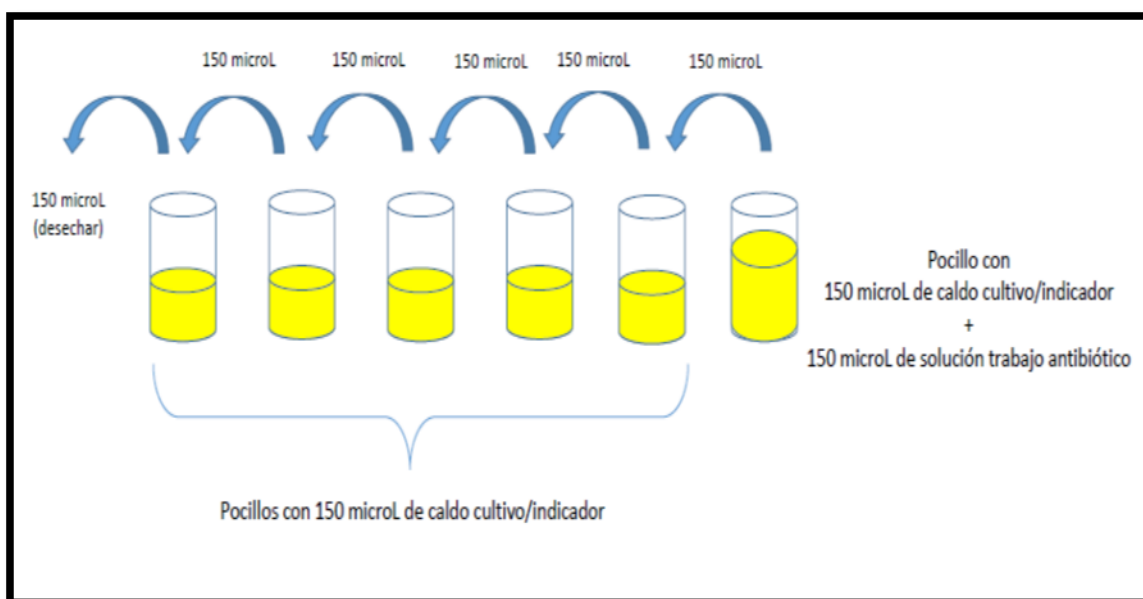


Figura 51. Procedimiento para la inoculación de diluciones seriadas de antibiótico en los pocillos de una placa ELISA.

Columna 6 y 12 (control positivo)

Estas columnas no contienen antibiótico, solo el caldo de cultivo/indicador. Por tanto, estos pocillos actúan como control de crecimiento bacteriano.

Columna 1 - 5 y 7 - 11 (ej. amoxicilina/ác. clavulánico)

Partiendo de la solución de trabajo de amoxicilina/ác. clavulánico, se añadieron 150 μ l en el primer pocillo de la fila A (a excepción de los pocillos A6 y A12) y se homogenizaron con los 150 μ l previamente añadidos de la solución de BHI-VT o MH-VT.

A continuación, se pipetearon 150 μ l de la solución del primer pocillo de la fila A con agente antimicrobiano y se inocularon en el pocillo que le precede (B1-B5 y B7-B11) y se homogenizaron con los 150 μ l previamente añadidos de la solución que contiene el caldo de cultivo y el indicador de crecimiento bacteriano (figura 51).

Se realizó el mismo proceso de forma sucesiva hasta llegar al último pocillo de cada columna (H1-H5 y H7-H11), en el cual, después de la homogeneización con los 150 μ l previamente añadidos, se desecharon 150 μ l con el fin de asegurar un volumen final en todos los pocillos de 150 μ l.

Posteriormente, se desecaron las soluciones inoculadas en las placas ELISA en una estufa a 37°C en aerobiosis.

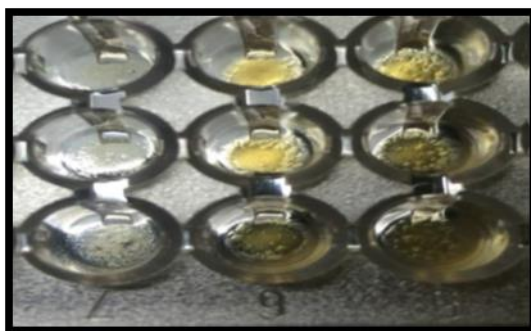


Figura 52. Resultado de la textura final alcanzada en los pocillos tras el proceso de desecación.

3.4.2.- Reactivos utilizados en el proceso de impregnación

Básicamente, los reactivos utilizados para la impregnación del dispositivo POC son: medios de cultivo, indicadores de crecimiento bacteriano y antibióticos.

3.4.2.1.- Medios de cultivo

Es el reactivo responsable de aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Se utilizaron medios de cultivo líquidos (caldos) para su posterior desecación.

McConkey

Medio diferencial y selectivo de microorganismos Gram negativos. La adición de lactosa en el medio, permite diferenciar a los microorganismos fermentadores (rosa/rojo) de los no fermentadores (incoloros).

- Estado inicial: medio deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: Disolver 40 g de medio en 1 litro de agua bidestilada.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: 70144-500G.
- Precio (año 2016): 99 euros/500 gramos.

Con el fin de seleccionar el medio de cultivo idóneo para las pruebas de sensibilidad antibiótica en el dispositivo, los ensayos se han realizado por duplicado utilizando los dos medios de cultivos descritos a continuación:

Caldo BHI (*Brain-Heart Infusion*):

Es un medio rico en nutrientes y no selectivo, adecuado para el crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, que además permite el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes (ej. *Streptococcus*).

- Estado inicial: medio deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: Disolver 37 g de medio en 1 litro de agua bidestilada.
- Triple concentrado: Disolver 111 g de medio en 1 litro de agua bidestilada.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: 53286-100G.
- Precio (año 2016): 35,5 euros/100 gramos.

Caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} :

Es un medio de cultivo no selectivo habitualmente utilizado para pruebas de sensibilidad antibiótica. La suplementación con Ca^{2+} y Mg^{2+} , favorece la reproducibilidad de los valores de CMI de los aminoglucósidos frente a *P.aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos.

- Estado inicial: medio deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: Disolver 22 g de medio en 1 litro de agua bidestilada.
- Triple concentrado: Disolver 66 g de medio en 1 litro de agua bidestilada.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: 90922-500G.
- Precio (año 2016): 96,2 euros/500 gramos.

Para el proceso de impregnación, se valoró que los medios de cultivo utilizados para determinar la sensibilidad antibiótica de los microorganismos (BHI y Mueller-Hinton) estuvieran a concentración normal (concentración de uso) o triple concentrados.

Por ello, se realizaron distintos ensayos para comprobar que la modificación de la concentración de uso del medio de cultivo no afectaba al rendimiento del mismo.

Para dar validez a la nueva concentración de los medios de cultivo, se comprobó la **productividad** y el **pH** de los medios a ambas concentraciones.

➤ **Ensayos de productividad de los medios de cultivo**

Para el ensayo de productividad se siguieron las pautas indicadas en la *UNE-EN ISO 11133:2014 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimientos de los medios de cultivo*.

Procedimiento

Para el ensayo de productividad de los medios de cultivo, se trabajó con las siguientes cepas de referencia del laboratorio en fase estacionaria de crecimiento:

- *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922, Migula 1895).
- *Klebsiella oxytoca* CECT 8207 (WDCM00096, Flüggé 1886).

En primer lugar, se seleccionó un número apropiado de tubos de 10 ml del lote de medios de cultivo en estudio.

Para ello, se sembró 0,1 ml de cada dilución decimal de la cepa, en medio sólido no selectivo TSA y en los siguientes tubos de medio líquido en estudio:

- Mueller-Hinton a concentración normal y a triple concentración.
- BHI a concentración normal y a triple concentración.

A continuación, tanto los tubos de medio de cultivo líquido inoculados, como los cultivos de medio sólido (TSA), se incubaron a 37°C durante 24 horas ± 3h.

Posteriormente, se realizó un pase con asas de 10 µl desde los tubos de medio líquido a medios sólidos TSA.

La productividad de un medio de enriquecimiento líquido se define como satisfactoria si se observa un crecimiento del microorganismo de al menos 10 ufc procedentes del asa de 10 µl, a partir de la dilución que proporciona menos de 100 ufc en 0,1 ml en la placa de agar no selectivo inicial (TSA).

➤ **Ensayos de pH de los medios de cultivo**

Con el fin de determinar si la modificación de las concentraciones de uso de los medios de cultivo, afecta a este parámetro, se midió el pH de los medios en las condiciones descritas anteriormente, mediante un pH-metro digital.

3.4.2.2.- Indicadores de crecimiento bacteriano

Son reactivos que mediante un cambio de color, permiten revelar/detectar el crecimiento/metabolismo de las bacterias en el interior de los pocillos.

Indicador (incoloro o color A) $\xrightarrow{\text{crecimiento bacteriano}}$ **Indicador** (color B).

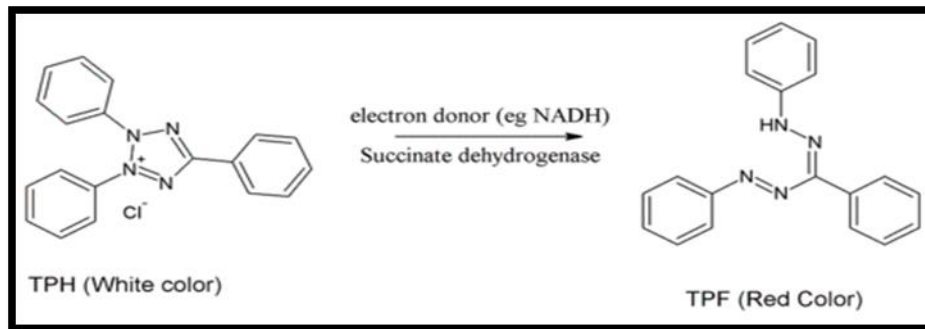


Figura 53. Reacción de óxido-reducción del cloruro de tetrazolio.

Pueden ser de dos tipos:

A) Cromóforos

Se trata de indicadores redox para la detección de productos metabólicos, y consecuentemente de células viables.

Ejemplos:

1) *Violeta de tetrazolio (VT)*

Se trata de una sal orgánica redox que es soluble e incolora en estado oxidado, pero que se convierte en insoluble y de color violeta en estado reducido (como consecuencia del metabolismo bacteriano).

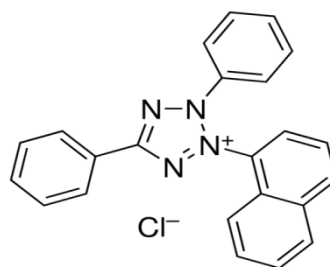


Figura 54. Estructura química de la molécula violeta de tetrazolio.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: 0,005% p/v (= g/100 ml) = 0,005 g soluto/100 ml disolución.
Para ello, se disuelven 0.0125 g en 25 ml de agua bidestilada estéril.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: 88193-1G.
- Precio (año 2016): 60 euros/1 gramo.

Ensayo de validación del violeta de tetrazolio

Se llevó a cabo el protocolo de impregnación estándar utilizando como reactivo revelador de crecimiento bacteriano el violeta de tetrazolio.

2) Resazurina (RZ)

Es un indicador soluble y redox, que es de color azulado en estado oxidado, pero que se vuelve de color rosa-fucsia en estado reducido (como consecuencia del metabolismo bacteriano).

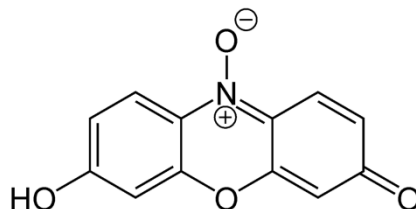


Figura 55. Estructura química de la molécula resazurina.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: 0,005% p/v (= g/100 ml) = 0,005 g soluto/100 ml disolución.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: 199303-1G.
- Precio (año 2016): 27,10 euros/1 gramo.

Ensayo de validación de la resazurina

Se llevó a cabo el protocolo de impregnación estándar utilizando como reactivo revelador de crecimiento bacteriano la resazurina.

B) Fluoróforos

Es un componente de una molécula que hace que ésta emita fluorescencia. Se trata de un grupo funcional de la molécula que absorberá energía a una longitud de onda específica y la emitirá en otra de mayor longitud de onda. El cambio de color ocurre en el espectro UV.

Ejemplo:

1) 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG)

Este compuesto actúa como sustrato del enzima β -glucuronidasa, presente en algunos microorganismos causantes de infección urinaria como es el caso de *E.coli*. Dicho compuesto se hidroliza y genera el compuesto intermediario 4-metilumbeliferil, que emite fluorescencia azul bajo la luz UV de la lámpara de Wood o un transluminador UV.

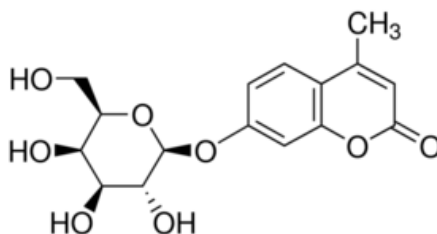


Figura 56. Estructura química de la molécula 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: 0,1 mg/ml.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: 18493-5VL.
- Precio (año 2016): 51 euros/envase.

Ensayo de validación del fluoróforo MUG

Para la evaluación del fluoróforo MUG, se realizó un ensayo en el que se seleccionaron, al azar, 20 cepas de *Escherichia coli*, procedentes de pacientes con bacteriuria significativa y con sensibilidad variable a diversos antibióticos de uso común. En todas las cepas se realizó el estudio de sensibilidad antibiótica mediante dos procedimientos pareados:

A) Método estándar (*gold standard*). Paneles NUC52 del sistema MicroScan Walkaway (Beckman-Coulter®), procesados siguiendo las indicaciones del fabricante, incubados en el sistema y con lectura a las 18 horas.

B) Método a estudio (*fluoróforo MUG*). Utilización de los mismos paneles pero con la adición de 10 µl/pocillo de MUG al 1%, incubados en aerobiosis a 37° C y lecturas cada hora bajo luz UV.

Se realizó un análisis comparativo de los resultados de sensibilidad antibiótica obtenidos por los dos procedimientos.

3.4.2.3.- Antibióticos

1) Vancomicina

La vancomicina es un antibiótico glucopeptídico para el que la mayoría de bacterias Gram positivas son sensibles. La detección de crecimiento bacteriano en el pocillo del dispositivo que contiene este antibiótico, indicará de forma fehaciente que el agente causal de la infección es una bacteria Gram negativa.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI (µg/ml) indicadas en *CLSI*.
- Aplicación: Categorización Gram de la bacteria.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: V0045000.
- Precio (año 2016): 119 euros/100 miligramos.

2) Colistina

La colistina es una polimixina para el que la mayoría de bacterias Gram negativas son sensibles. La detección de crecimiento bacteriano en el pocillo del dispositivo que contiene este antibiótico indicará de forma fehaciente que se trata de una bacteria Gram positiva.

Para estudios de sensibilidad se debe usar la colistina-sulfato, en lugar de la colistina metano-sulfonato (CLSI 2014).

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI (µg/ml) indicadas en documentos *CLSI*.
- Aplicación: Categorización Gram de la bacteria.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: V0045000.
- Precio (año 2016): 119 euros/100 miligramos.

3) Ampicilina

La ampicilina es un antibiótico beta-lactámico que ha sido extensamente utilizado para tratar infecciones bacterianas. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis del peptidoglicano, alterando la permeabilidad de la pared de la bacteria y muriendo ésta por efecto osmótico. Su espectro de acción cubre microorganismos Gram positivos, Gram negativos y algunos microorganismos anaerobios.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI (µg/ml) indicadas en documentos *CLSI*.
- Aplicación: para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: A9393-5G.
- Precio (año 2016): 57,40 euros/5 gramos.

4) Amoxicilina/ácido clavulánico

Al igual que la ampicilina, la amoxicilina/ácido clavulánico es un antibiótico de la familia de los beta-lactámicos. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis del peptidoglicano, alterando la permeabilidad de la pared de la bacteria. Se trata de un antibiótico comúnmente usado en el tratamiento de la ITU con un espectro de acción que incluye tanto microorganismos Gram positivos como Gram negativos.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI (µg/ml) indicadas en documentos *CLSI*.
- Aplicación: para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: SMB00607.
- Precio (año 2016): 169 euros/gramo.

5) Ciprofloxacino

El ciprofloxacino es un antibiótico perteneciente a la familia de las quinolonas. Bloquea la actividad de las enzimas topoisomerasas, inhibiendo la replicación del DNA bacteriano. Se trata de un antibiótico ampliamente usado en el tratamiento de las infecciones urinarias ya que es activo frente a la mayoría de microorganismos uropatógenos.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI (µg/ml) indicadas en documentos *CLSI*.
- Aplicación: para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: C2190000.
- Precio (año 2016): 125 euros/envase.

6) Cotrimoxazol

El cotrimoxazol es la asociación de trimetoprim con sulfametoxazol. Se trata de un antibiótico bactericida que inhibe las síntesis del ácido folínico, precursor de la síntesis de DNA. Tiene un espectro de acción activo frente a los principales microorganismos Gram positivos y Gram negativos causantes de ITU.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI (µg/ml) indicadas en documentos *CLSI*.
- Aplicación: para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: A2487.
- Precio (año 2016): 441 euros/ml.

7) Fosfomicina

La fosfomicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de los precursores del peptidoglicano. Se trata de un antibiótico ampliamente usado en el tratamiento de la infección urinaria dado su amplio espectro de acción y su cómoda posología.

Se trata de un antibiótico que debe ir suplementado con glucosa-6-fosfato para facilitar la entrada del antibiótico al interior de la bacteria. La concentración final de glucosa-6-fosfato debe de ser de 25 mg/l.

- Concentración inicial: polvo deshidratado para rehidratar.
- Concentración de uso: según CMI's ($\mu\text{g/ml}$) indicadas en documentos *CLSI*.
- Aplicación: para conocer la sensibilidad bacteriana.
- Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
- Referencia: P5396.
- Precio (año 2016): 44 euros/gramo.

3.4.2.4.- Otros reactivos

➤ Solventes y diluyentes

Para la preparación de las soluciones de trabajo de cada uno de los antibióticos, se debe trabajar con los solventes y diluyentes recomendados por la guía de referencia *CLSI*.

Los solventes y diluyentes recomendados para cada uno de los antibióticos impregnados en el dispositivo se recogen en la siguiente tabla:

ANTIBIÓTICO	SOLVENTE	DILUYENTE
vancomicina	agua	agua
colistina	agua	agua
ampicilina	Tampón fosfato (pH: 8,0; 0,1 mol/l)	Tampón fosfato (pH: 6,0; 0,1 mol/l)
amoxicilina/ácido clavulánico	Tampón fosfato (pH: 6,0; 0,1 mol/l)	Tampón fosfato (pH: 6,0; 0,1 mol/l)
fosfomicina	agua	agua
ciprofloxacino	agua	agua

cotrimoxazol:		
- <i>Sulfametoxazol</i>	½ volumen de agua caliente en una cantidad mínima de 2,5 mol/l NaOH.	agua
- <i>Trimetoprim</i>	0,05 mol/L de ácido láctico o HCL al 10% del volumen final.	agua caliente

Tabla 3. Relación de solventes y diluyentes recomendados para la preparación de las soluciones de trabajo de cada antibiótico.

3.4.3.- Cálculo de las concentraciones críticas de antibiótico

3.4.3.1.- Ensayos con amoxicilina/ácido clavulánico

➤ Ensayos con cepas de referencia

Para determinar las concentraciones de antibiótico idóneas que debe albergar cada pocillo del dispositivo POC, se han tenido en cuenta los puntos de corte establecidos por la Guía *CLSI*. Además de las concentraciones críticas que definen la categoría sensible o resistente de una bacteria, se han valorado concentraciones de orden superior e inferior. Asimismo, para el cálculo de la concentración de antibiótico, se ha tenido en cuenta, el término “Potencia” o “Pureza”, el cual se define como los miligramos de sustancia pura por cada miligramo de sustancia valorada.

La determinación de la actividad antimicrobiana mediante técnicas de dilución, se realiza normalmente utilizando una escala discontinua, habitualmente concentraciones crecientes en base 2, en lugar de una escala continua.

De esta manera, los valores de CMI de un determinado antimicrobiano se encontrarán en algún valor situado entre la CMI experimentalmente obtenida y la concentración inmediatamente inferior (en el caso de los antibióticos bacteriostáticos).

Para validar las condiciones de impregnación inicialmente establecidas (protocolo estándar), definir el inóculo bacteriano de trabajo y determinar la concentración crítica

de antibiótico que debe albergar cada pocillo del dispositivo POC-ITU, se realizó en primera instancia, ensayos en placas ELISA impregnadas con amoxicilina/ácido clavulánico. Para ello, se enfrentaron columnas con la misma cantidad de antibiótico (en concentraciones logarítmicas crecientes en base dos), frente a diferentes inóculos bacterianos. Además, se definió una columna como control positivo (ausencia de antimicrobiano) para verificar la viabilidad de las placas (figura 57).

Una de las columnas albergaría el inóculo estándar de trabajo en pruebas de microdilución ($\frac{1}{2} 10^{-3} \approx 5,0 \times 10^4$ ufc/pocillo), con el fin de determinar la CMI real del microorganismo.

Para el cálculo de los inóculos bacterianos se ha tenido en cuenta el procesamiento previo de la muestra de orina, antes de su inoculación en el definitivo dispositivo POC, es decir, una dilución 1/500 de la orina y la inoculación de 150 μ l de esa dilución en los pocillos del dispositivo.

Para este primer ensayo con el antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico, se utilizaron las cepas de referencia del laboratorio: *E.coli* CECT 434 y *K.oxytoca* CECT 8207.

Para la preparación de la solución de trabajo de amoxicilina/ácido clavulánico, se procedió de dos maneras. Por un lado, se trabajó con soluciones del antibiótico preparadas 7 días antes del ensayo, las cuales se congelaron a -4 °C y se descongelaron 1 hora antes de su uso. Por otro lado, se trabajó con soluciones de amoxicilina/ácido clavulánico preparadas en el mismo momento del ensayo.

Se inocularon 150 μ l de las distintas diluciones bacterianas en diferentes placas ELISA y se incubaron a 37°C \pm 1°C. Al mismo tiempo, se cuantificaron los inóculos de partida por siembra en medio sólido TSA.

Los resultados se obtienen tras dejar la placa ELISA diez horas en incubación.

A	128 mg/l												
B	64 mg/l												
C	32 mg/l												
D	16 mg/l												
E	8 mg/l												
F	4 mg/l												
G	2 mg/l												
H	1 mg/l												
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB
Columna		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6

	Brain Heart Infusion		Mueller-Hinton
--	----------------------	--	----------------

Figura 57. Esquema de la placa ELISA impregnada con distintas diluciones de antimicrobiano (ej. amoxicilina/ác. clavulánico) frente a distintos inóculos bacterianos.

➤ Ensayos con cepas clínicas

En un segundo ensayo, se trabajó con microorganismos aislados a partir de muestras clínicas de orina en el laboratorio de Microbiología (cepas clínicas).

Se trabajó con cepas de *E.coli* previamente caracterizadas mediante los métodos de referencia habitualmente utilizados en el laboratorio (microdilución en caldo y difusión disco-placa).

El perfil de sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico, de estos microorganismos, se resume en la siguiente tabla:

Cepa (n° referencia)	CMI (mg/l)	Interpretación CMI	Disco-placa (mm)	Interpretación Disco-placa
11-00	8	S	19	S
15-28	16	I	11	R
54-11	16	I	13	R
10-04	4	S	19	S
10-75	4	S	16	I
79-17	16	I	10	R

Tabla 4. Perfil de sensibilidad de las distintas cepas de *E.coli* utilizadas en el ensayo para el cálculo de las concentraciones críticas de antibiótico.

Para este ensayo, se trabajó con placas ELISA impregnadas en las siguientes condiciones:

- 1) Adición de 50 µl a cada pocillo de la placa ELISA de medio Mueller-Hinton triple concentrado con 0,005% de violeta de tetrazolio.
- 2) Desecación de 6 horas a 37°C ± 1°C.
- 3) Adición de 10 µl de antibiótico y posterior secado durante 2 horas a 22°C ± 1°C.

Además, se trabajó con inóculos bacterianos representativos de orinas con distinto recuento:

~ **Inóculo 1/2 de 10⁻³ (aprox. 50.000 ufc/pocillo):** Concentración de microorganismo recomendada para estudios de sensibilidad antibiótica por microdilución, con el fin de caracterizar la CMI real del microorganismo.

~ **Inóculo 1/3 de 10⁻⁵:** Concentración de microorganismo representativa de una orina con un recuento de >100.000 ufc/ml.

~ **Inóculo 1/3 de 10⁻⁶:** Concentración de microorganismo representativa de una orina en el límite del punto de corte de aproximadamente ≈100.000 ufc/ml.

~ **Inóculo 1/2 10⁻⁷:** Concentración de microorganismo representativa de una orina con un recuento entre 10.000 ufc/ml y 100.000 ufc/ml.

~ **Inóculo 10⁻⁸:** Concentración de microorganismo representativa de una orina con un recuento de <10.000 ufc/ml.

Los resultados se obtienen tras dejar la placa ELISA en incubación, haciendo lectura de la misma a las 7±1 horas y 22±1 horas y posterior verificación de la presencia o ausencia de crecimiento mediante examen macroscópico en fresco.

A	128 mg/l												
B	64 mg/l												
C	32 mg/l												
D	16 mg/l												
E	8 mg/l												
F	4 mg/l												
G	2 mg/l												
H	1 mg/l												
		1/2 10⁻³	1/3 10⁻⁵	1/3 10⁻⁶	1/2 10⁻⁷	10⁻⁸	Sin ATB	1/2 10⁻³	1/3 10⁻⁵	1/3 10⁻⁶	1/2 10⁻⁷	10⁻⁸	Sin ATB
Columna		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6

	Brain Heart Infusion		Mueller-Hinton
--	----------------------	--	----------------

Figura 58. Esquema placa ELISA impregnada con distintas diluciones de antimicrobiano (ej. amoxicilina/ác. clavulánico) frente a distintos inóculos bacterianos representativos de orinas con distinto recuento.

3.4.3.2.- Ensayos con el resto de antibióticos

➤ Ensayos con cepas clínicas

Para determinar si el patrón de funcionalidad observado en los ensayos con amoxicilina/ácido clavulánico, es reproducible para el resto de antibióticos, se trabajó con placas ELISA impregnadas en las mismas condiciones.

Se realizaron un total de 42 ensayos utilizando seis cepas de *E.coli* previamente caracterizadas con diferentes perfiles de sensibilidad frente a siete antibióticos distintos. Además, se determinó el rendimiento de las cepas mediante la metodología ya descrita, con el fin de trabajar con las mismas en fase estacionaria de crecimiento, y se calculó el valor asignado a cada pocillo y su correlación con la muestra de orina.

Los perfiles de sensibilidad antibiótica de las cepas seleccionadas para este ensayo se recogen en la siguiente tabla:

Cepa (n° ref.)	CMI (mg/l) AMC	Dp (mm) AMC	CMI (mg/l) FOS	Dp (mm) FOS	CMI (mg/l) CIP	Dp (mm) CIP	CMI (mg/l) AMP	Dp (mm) AMP	CMI (mg/l) SXT	Dp (mm) SXT
15-28	16 (I)	11 (R)	32 (S)	21 (S)	>4 (R)	8 (R)	≥32 (R)	0 (R)	<20 (S)	28 (S)
54-11	16 (I)	13 (R)	<16 (S)	23 (S)	<0.25 (S)	25 (S)	≥32 (R)	0 (R)	<20 (S)	27 (S)
10-04	4 (S)	19 (S)	<16 (S)	21 (S)	<0.25 (S)	27 (S)	≤2 (S)	21 (S)	<20 (S)	26 (S)
10-75	4 (S)	16 (I)	<16 (S)	24 (S)	>4 (R)	0 (R)	≥32 (R)	0 (R)	<20 (S)	27 (S)
10-17	>16 (R)	0 (R)	32 (S)	18 (S)	<0.5 (S)	25 (S)	≥32 (R)	0 (R)	<2/38 (S)	28 (S)
54-08	>32 (R)	10 (R)	<16 (S)	16 (S)	>4 (R)	9 (R)	≥32 (R)	0 (R)	>320 (R)	0 (R)

Tabla 5. AMC: amoxicilina/ác. clavulánico; FOS: fosfomicina; CIP: ciprofloxacino; AMP: ampicilina; SXT: cotrimoxazol; Dp: disco-placa; CMI: concentración mínima inhibitoria.

Para cada serie combinada de microorganismo/antibiótico, se trabajó con placas ELISA impregnadas con concentraciones crecientes de antibiótico en base dos. Una de las columnas se inoculó con una carga bacteriana de $\frac{1}{2} 10^{-3}$ (aprox. 50.000 ufc/pocillo) correspondiente al inóculo de trabajo en técnicas de microdilución, con el fin de definir la CMI de la bacteria, y comprobar que coincide con la CMI real determinada mediante los métodos de referencia, para cada uno de los antibióticos testados.

El resto de columnas albergan inóculos bacterianos representativos de orinas con recuento elevado $1/3 10^{-5}$ ($>10^5$ ufc/ml), una orina con recuento en el punto de corte $1/3 10^{-6}$ ($\approx 10^5$ ufc/ml) y una orina con recuento de $\frac{1}{2} 10^{-7}$ ($10^5 - 10^4$ ufc/ml) (figura 59).

Los resultados se obtienen tras dejar la placa ELISA en incubación, haciendo lectura de la misma a las 7 ± 1 horas y 9 ± 1 horas y posterior verificación de la presencia o ausencia de crecimiento mediante examen macroscópico en fresco.

Antibiótico		Cepa n°			
A	CMI mg/l				
B	CMI mg/l				
C	CMI mg/l				
D	CMI mg/l				
E	CMI mg/l				
F	CMI mg/l				
G	CMI mg/l				
H	CMI mg/l				
Inóculo		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación					

	Mueller-Hinton
--	----------------

Figura 59. Esquema placa ELISA para el ensayo de diferentes antibióticos frente a distintos inóculos representativos de orinas con distinto recuento.

3.4.4.- Tiempo de secado

Las variables a controlar y combinar en este bloque experimental fueron: tiempo, temperatura y volumen de reactivo inoculado en el dispositivo.

Temperatura de secado

Se establecieron inicialmente las temperaturas de secado de 22°C, 30°C y 37°C, por adaptación a los equipos de incubación empleados en el laboratorio donde se llevaron a cabo los ensayos.

Las placas ELISA, una vez inoculadas con todos los reactivos necesarios (caldo de cultivo, indicador de crecimiento bacteriano y antibiótico), se desecaron en equipos

isotermos con ventilación forzada, en las condiciones de temperatura indicadas anteriormente.

Tiempo de secado

Se controló el desarrollo del proceso de desecación, observando las placas a intervalos comprendidos entre 60 y 90 minutos.

Volumen

Se ensayaron distintos volúmenes de inoculado en cada pocillo con el fin de determinar si este factor tiene una importancia relevante, en el tiempo total de secado, en la degradación del antibiótico y en la textura final del sedimento reconstituible.

En concreto, para cada temperatura de trabajo, se ensayaron los siguientes bloques de volumen/tiempo:

- **50 µl de caldo de cultivo en 3 inoculaciones.** Tras cada inoculación, se controló el tiempo de secado completo de la alícuota sembrada, y posteriormente se superpuso de forma sucesiva las siguientes alícuotas de 50 µl.
- **75 µl de caldo de cultivo en 2 inoculaciones.** Tras la inoculación de la primera alícuota, se controló el tiempo de secado completo de la misma, y posteriormente se superpuso de forma sucesiva la segunda alícuota de 75 µl.
- **150 µl de caldo de cultivo en 1 inoculación.** Se inoculó de una sola vez todo el volumen del medio de cultivo.
- **50 µl de caldo de cultivo en 1 inoculación.** Se inocula de una sola vez todo el volumen del medio de cultivo triple concentrado.

Para cada una de las combinaciones se controló el estado de desecación del dispositivo hasta que se alcanzó una capa final de revestimiento con la textura adecuada.

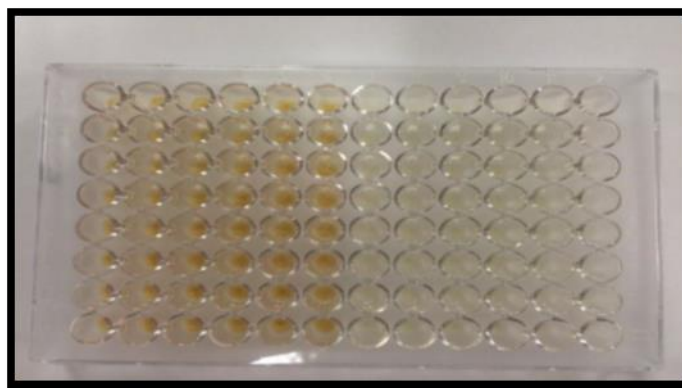


Figura 60. Placa ELISA tras la desecación con BHI (izquierda) y Mueller-Hinton (derecha).

3.4.5.- Protocolo de impregnación del dispositivo POC-ITU

Una vez definidas las condiciones de trabajo idóneas de los reactivos del dispositivo POC en base a los resultados de los ensayos descritos anteriormente, se diseñó un protocolo para impregnar de forma estandarizada y reproducible, los pocillos del elemento Receptor del dispositivo POC-ITU.

➤ **Reactivos:**

a) *Medios de cultivo*

Caldo McConkey

Se trabajó con el medio de cultivo McConkey a la concentración indicada por el fabricante (40 g de medio de cultivo en 1 litro de agua bidestilada).

Caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes Ca^{2+} y Mg^{2+}

Se trabajó con el medio de cultivo Mueller-Hinton suplementado con Ca^{2+} y Mg^{2+} a triple concentración (66 g de medio de cultivo en 1 litro de agua bidestilada).

b) *Indicador de crecimiento bacteriano*

Violeta de tetrazolio

Se utilizó como indicador de crecimiento bacteriano el violeta de tetrazolio a la concentración de uso definida por el fabricante (0,005% p/v (= g/100 ml) = 0,005 g soluto/100 ml disolución).

c) *Antibióticos*

La concentración de las soluciones iniciales de trabajo para cada antibiótico, así como la alícuota de uso de cada uno de ellos, quedaron definidas de la siguiente manera:

Vancomicina

Polvo concentrado para solución en perfusión.

(Potencia 95%).

Cada vial contiene:

- 1.000 mg de clorhidrato de vancomicina.

Solución inicial 512 µg/ml: 80,64 mg en 10 ml de agua bidestilada.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

Colistina

Polvo para solución inyectable/inhalación por nebulizador.

(Potencia 92,8%).

Cada vial contiene: 80 mg colistina.

Solución inicial 32 µg/ml: 4,8 mg en 10 ml de agua bidestilada.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

Ampicilina

Polvo concentrado para perfusión EFG.

(Potencia 92,8%).

Cada vial contiene: 1.000 mg de ampicilina (DCI) (sódica).

Solución inicial 512 µg/ml: 82,75 mg en 10 ml de PSB.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

Amoxicilina/Ácido clavulánico

Polvo para solución inyectable y para perfusión EFG.

(Potencia 95%).

Cada vial contiene:

- 500 mg de amoxicilina (como amoxicilina sódica).
- 50 mg de ácido clavulánico (como clavulanato potásico).

Solución inicial 512 µg/ml: 80,64 mg en 10 ml de PBS.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

Ciprofloxacino

Solución para perfusión EFG.

(Potencia 98%).

Cada solución contiene: 200 mg/100 ml.

Solución inicial 16 µg/ml: dilución 1/10 de la solución original en agua bidestilada.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

Cotrimoxazol

Polvo para solución inyectable.

(Potencia 99%).

Cada vial contiene:

- Sulfametoxazol: 800 mg.
- Trimetoprim: 160 mg.

Solución inicial 128 µg/ml: 0,9 ml de solución inicial en 11 ml de agua bidestilada.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

Fosfomicina

Polvo para solución inyectable y para perfusión EFG.

(Potencia 70%).

Cada vial contiene:

- Fosfomicina (D.C.I.) (disódica): 1g.
- Ácido succínico recristalizado: c.s.

Solución inicial 512 µg/ml: 99,8 mg en 10 ml de agua bidestilada.

(Adición de 10 µl en cada pocillo para un volumen final de 150 µl).

➤ **Procedimiento:**

Esquema de distribución de los reactivos en cada pocillo del dispositivo POC-ITU:

Pocillo	Reactivo/Antibiótico	Concentración
C <i>(control de crecimiento)</i>	MH + VT (sin antibiótico)	MH: Triple concentrado VT: Concentración de uso
1	McConkey	Concentración de uso
2	colistina	8 mg/l
3	vancomicina	8 mg/l
4	ampicilina	32 mg/l
5	amoxicilina/ác. clavulánico	32 mg/l
6	fosfomicina + glucosa 6- fosfato	128 mg/l + 25 mg/l
7	cotrimoxazol	8 mg/l
8	ciprofloxacino	4 mg/l

Tabla 6. Distribución de los distintos reactivos del dispositivo POC-ITU.

1) Se adicionan a cada uno de los pocillos los reactivos de la siguiente manera:

a) **Pocillo C:** 50 µl de medio Mueller-Hinton triple concentrado conteniendo el indicador de crecimiento bacteriano (violeta de tetrazolio) a una concentración del 0,005%.

b) **Pocillo 1:** 50 µl del medio McConkey a la concentración indicada por el fabricante.

c) **Pocillo 2 – 8:** 50 µl de medio Mueller-Hinton triple concentrado conteniendo el indicador de crecimiento bacteriano (violeta de tetrazolio) a una concentración del 0,005%.

2) Posteriormente, se deseca la solución durante 6 horas a 37°C ± 1°C.

3) A continuación, se adicionan 10 μ l del antibiótico en el pocillo correspondiente y se deseca durante 2 horas a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figura 61. Dispositivo POC-ITU tras el proceso de impregnación.

3.5.- TIEMPO DE LECTURA DEL DISPOSITIVO

Para definir el tiempo de positividad/lectura del dispositivo, se llevaron a cabo distintos ensayos utilizando las placas ELISA como soporte de impregnación. Dichas placas, se impregnaron en las condiciones definidas según los resultados de los ensayos previos con amoxicilina/ácido clavulánico. Estas condiciones se resumen a continuación:

- Adición de 50 μ l de medio Mueller-Hinton triple concentrado con un tiempo de desecación de 6 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Adición de 10 μ l de antibiótico y posterior secado durante 2 horas a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Las placas una vez impregnadas se han mantenido en refrigeración entre 24 y 72 horas protegidas de la luz.

Se realizaron un total de 42 ensayos utilizando seis cepas de *E.coli* previamente caracterizadas con diferentes perfiles de sensibilidad frente a siete antibióticos distintos. Se trabajó con cepas en fase estacionaria de crecimiento y se calculó el valor asignado a cada pocillo y su correlación con la muestra de orina.

Para cada serie combinada de microorganismo/antibiótico, se trabajó con placas ELISA impregnadas con concentraciones crecientes de antibiótico en base dos. Una de las columnas se inoculó con una carga bacteriana de $\frac{1}{2} 10^{-3}$ (aprox. 50.000 ufc/pocillo) correspondiente al inóculo de trabajo en técnicas de microdilución, con el fin de definir la CMI de la bacteria, y comprobar que coincide con la CMI real determinada mediante los métodos de referencia, para cada uno de los antibióticos testados.

El resto de columnas contienen inóculos bacterianos representativos de orinas con recuento elevado $\frac{1}{3} 10^{-5}$ ($>10^5$ ufc/ml), una orina con recuento en el punto de corte $\frac{1}{3} 10^{-6}$ ($\approx 10^5$ ufc/ml) y una orina con recuento de $\frac{1}{2} 10^{-7}$ ($10^5 - 10^4$ ufc/ml) (figura 62).

Antibiótico		Cepa n°			
A	CMI mg/l				
B	CMI mg/l				
C	CMI mg/l				
D	CMI mg/l				
E	CMI mg/l				
F	CMI mg/l				
G	CMI mg/l				
H	CMI mg/l				
Inóculo		$\frac{1}{2} 10^{-3}$	$\frac{1}{3} 10^{-5}$	$\frac{1}{3} 10^{-6}$	$\frac{1}{2} 10^{-7}$
Interpretación					

	Mueller-Hinton
--	----------------

Figura 62. Esquema placa ELISA para el ensayo de distintos antibióticos y definición del tiempo de lectura del dispositivo.

Para determinar el tiempo de positividad se realizaron lecturas cada hora a partir de las 4 horas de incubación de las placas ELISA a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

El objetivo era acotar y establecer el intervalo del tiempo de lectura, al cual se define la CMI real del microorganismo y se produce el viraje de color en los pocillos de las columnas con inóculos bacterianos representativos de orinas con recuento no significativo (<10.000 ufc/ml).

El intervalo de tiempo de lectura entre estas variables definiría el tiempo de lectura del dispositivo.

3.6.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DEL DISPOSITIVO POC-ITU

➤ Lectura e interpretación

Para la interpretación de los resultados del dispositivo POC-ITU, se leen conjuntamente los pocillos: C, 1, 2 y 3, que determinarán si la muestra es **positiva** (>100.000 ufc/ml), **negativa** (ausencia de crecimiento bacteriano o crecimiento no significativo (<10.000 ufc/ml)) o **contaminada** (colistina y vancomicina resistente, más lactosa positiva).

Solo en el caso de que el dispositivo determine la positividad de la muestra de orina, se procederá a valorar el antibiograma (pocillos 4, 5, 6, 7 y 8).

Pocillo C

0 = negativo (ausencia de color) → ausencia de crecimiento bacteriano → orina no patológica.

1 = positivo (color violeta) → crecimiento bacteriano significativo → orina patológica.

Pocillo 1

0 = negativo (color púrpura original) → ausencia de crecimiento bacteriano o microorganismo no fermentador de lactosa.

1 = positivo (viraje a amarillo) → crecimiento de microorganismo fermentador de lactosa.

Pocillo 2 - 8

0 = negativo (ausencia de color) → ausencia de crecimiento bacteriano (microorganismo sensible al antibiótico).

1 = positivo (color violeta) → crecimiento bacteriano (microorganismo resistente al antibiótico).

En caso de ausencia de crecimiento bacteriano en el pocillo C, el crecimiento en cualquier otro pocillo no es valorable (muestra negativa).

La detección de crecimiento bacteriano en el pocillo C y/o el pocillo 1 (McConkey), en ausencia de crecimiento en los pocillos 2 (colistina) y 3 (vancomicina), indica que la orina es negativa.

En el caso de que el dispositivo detecte crecimiento de un microorganismo Gram positivo (C/1/2/3 = 1/0/1/0) y el pocillo 1 (McConkey) haya virado (1/1/1/0), la muestra de orina se considerará positiva independientemente del resultado del pocillo 1.

La combinación C/1/2/3 = 1/0/1/1 corresponde a una identificación presuntiva de un microorganismo perteneciente al género *Proteus spp.*, *Morganella spp.* o *Providencia spp.* (microorganismos Gram negativos, no fermentadores de lactosa y resistencia intrínseca a colistina y vancomicina).

➤ **Algoritmo diagnóstico**

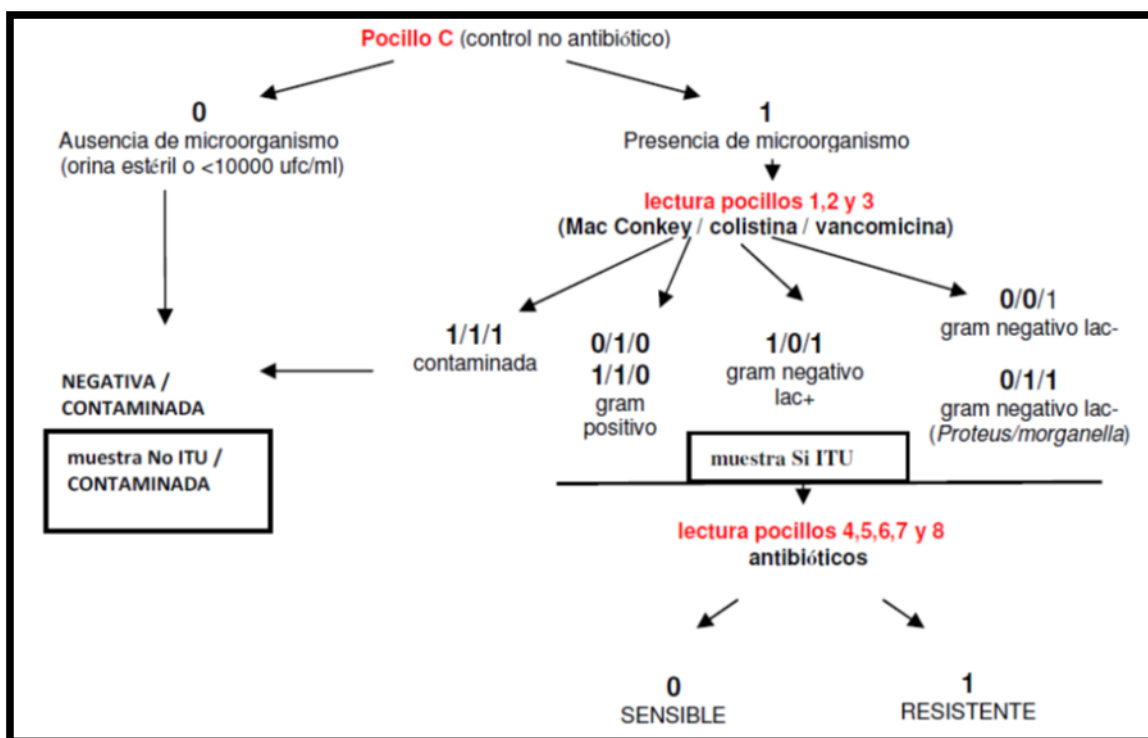


Figura 63. Algoritmo para la interpretación de resultados del dispositivo POC-ITU.

3.7.- ENSAYOS DE VALIDACIÓN

3.7.1.- Ensayo de validación multicéntrico

Se realizó un estudio prospectivo y multicéntrico durante el año 2015 en el que participaron los Servicios de Microbiología de los Hospitales Universitarios de La Paz (Madrid), Puerta de Hierro (Madrid) y La Ribera (Alzira, Valencia).

Recogida de orina

Las orinas recogidas por micción espontánea, sondaje vesical o catéter permanente, fueron recolectadas en los distintos centros hospitalarios participantes en el estudio y en sus respectivas dependencias sanitarias. Las orinas procedentes del entorno extrahospitalario se conservaron en nevera a 4°C en tubos de transporte con ácido bórico al 2% hasta su procesamiento (máximo 24 horas).

Pruebas de laboratorio

El procesamiento y selección de las muestras de orina, para ser testadas con el dispositivo, se realizó de la siguiente manera. Las muestras se sembraron por recuento mediante asa de siembra calibrada de 1 µl en medio cromogénico (Becton-Dickinson®) y se incubaron a 37°C en estufa de aerobiosis durante 18-24 horas. Una vez sembradas las muestras, éstas se conservaron en nevera a 4°C durante 18 horas. Tras la valoración del urinocultivo, se recuperaron aquellas muestras de orina con resultado negativo y positivo ($>10^5$ ufc/ml) para ser testadas con el dispositivo POC-ITU.

Cada una de las muestras de orina seleccionadas se ensayaron siguiendo las instrucciones de uso del dispositivo. Se inoculó el dispositivo con 150 µl de la muestra de orina previamente diluida a 1/500 (20 µl de orina en 10 ml de solución salina estéril). A continuación, se incubó en una estufa en aerobiosis a 37°C y se visualizaron los resultados a las 7±3 horas. Al mismo tiempo, se sembró por recuento en TSA, 1 µl de la dilución inoculada en el pocillo C del dispositivo, con el fin de comprobar que la carga bacteriana introducida en el pocillo era la deseada y que no existía crecimiento polimicrobiano.

Paralelamente, todas las bacterias de interés clínico aisladas en el urinocultivo, se identificaron y se determinó su perfil de sensibilidad antibiótica mediante los paneles NUC69 y POS42 del sistema comercial MicroScan WA (Beckman-Coulter®). Los resultados se interpretaron utilizando los puntos de cortes establecidos por *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Estos resultados fueron considerados el *gold standard* a efectos de sensibilidad antibiótica.

Mediante la hoja de recogida de datos (ver Anexo 8.5) se registraron los resultados obtenidos con el dispositivo POC-ITU y con el método de referencia.

Evaluación diagnóstica del dispositivo

Se cotejaron los resultados obtenidos en el dispositivo POC-ITU con los resultados del *gold standard* mediante tablas de contingencia de 2 x 2 para estimar la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y sus respectivos intervalos de confianza al 95%, así como, el grado de correlación (índice *kappa*) entre las dos técnicas.

Además, para determinar la validez del test diagnóstico se realizó un estudio estadístico mediante los programas informáticos SPSS (v 25.0) y GraphPad Prism (v 8.0). Para el estudio de frecuencias entre variables emparejadas, se realizó el test de McNemar, y para el estudio de frecuencias entre variables independientes, el test de la chi-cuadrado. En todos los casos se tomó el valor de $P \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

3.7.2.- Ensayo de validación a “pie de campo” (Zanzíbar)

El 7 de julio de 2017 organizamos, en colaboración con la ONG denominada Fundación NED (<http://nedfundacion.org>), una misión sanitaria al hospital Mnazi Mmoja, situado en la isla de Zanzíbar, Tanzania (<http://mnazimmoja.blogspot.com.es>).

Mnazi Mmoja es un hospital de 440 camas administrado por el Gobierno y ofrece servicio a la población más desprotegida y con menos recursos de Zanzíbar. Se encuentra en Stone Town, la capital de la isla. Cuenta con dotación de médicos locales e internacionales y está relativamente equipado para un hospital del mundo desarrollado.

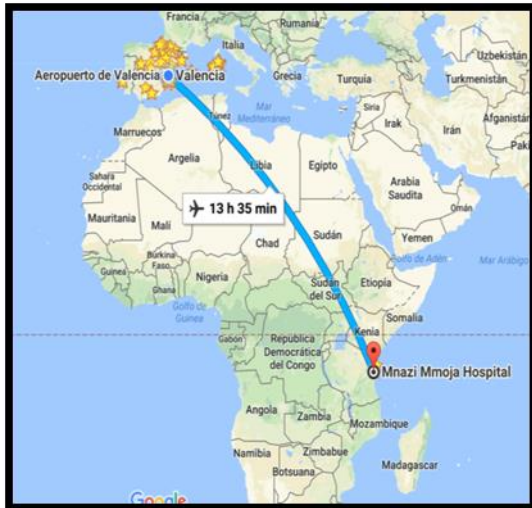


Figura 64. Mapa geográfico y localización del Hospital Mnazi Mmoja en la isla de Zanzíbar (Tanzania).

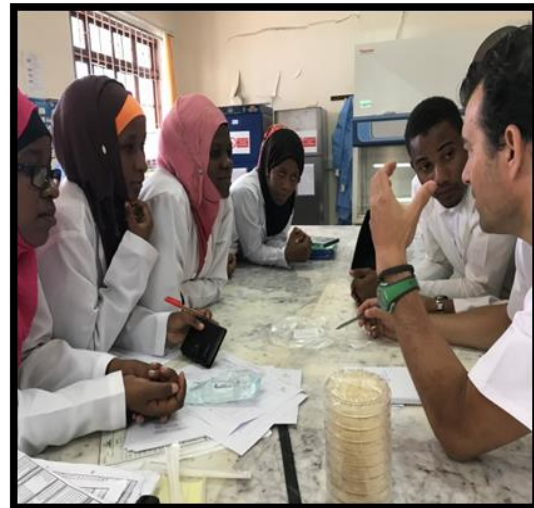


Figura 65. Presentación del dispositivo POC-ITU a los miembros del laboratorio de Microbiología del Hospital Mnazi Mmoja.

Durante la estancia, que comprendió desde el 7 al 28 de julio de 2017, realizamos las siguientes actividades:

- Presentación del dispositivo POC-ITU a los tres miembros del laboratorio de Microbiología del Mnazi Mmoja: metodología, protocolo de utilización y resultados obtenidos hasta la fecha.
- Empleo del dispositivo POC-ITU con muestras de orina procedentes de pacientes con sospecha de ITU.
- Comparación de los resultados obtenidos con el dispositivo y los medios disponibles en el laboratorio (*gold standard*), que básicamente consistían en el cultivo en medios convencionales (agar chocolate, agar sangre y agar McConkey). Dada la ausencia de técnicas microbiológicas para la caracterización de la sensibilidad bacteriana, los resultados del antibiograma del dispositivo POC-ITU no fueron evaluables.

4.- RESULTADOS:

4.1.- CÁLCULO DEL INÓCULO BACTERIANO DEL DISPOSITIVO POC-ITU

Tras la realización de los primeros ensayos con amoxicilina/ácido clavulánico, utilizando cepas de referencia y las condiciones de impregnación estándar iniciales, se verificó que el inóculo de trabajo que permite obtener la CMI más próxima a la CMI real de las cepas de referencia, es la dilución $\frac{1}{2} 10^{-3}$ (Aprox. $5,0 \times 10^4$ ufc/pocillo).

Además, este inóculo bacteriano es el recomendado por la SEIMC para los estudios de sensibilidad antibiótica mediante microdilución en caldo.

Con el resto de inóculos ensayados ($\frac{1}{3} 10^{-3}$, $\frac{1}{4} 10^{-3}$, $\frac{1}{5} 10^{-3}$) se obtienen valores de CMI muy similares a los obtenidos por los métodos de referencia. En comparación con el inóculo de trabajo recomendado por la SEIMC, hay una diferencia de ± 1 dilución de concentración de antimicrobiano en algunos casos.

Se determinó que trabajando con el inóculo de 10^{-1} (0,5 McFarland; Aprox. $1,5 \times 10^8$ ufc/ml), sin diluir, no se obtienen los resultados esperados para los estudios de sensibilidad antibiótica mediante microdilución, ya que la carga bacteriana es muy elevada, apreciándose crecimiento bacteriano en todos los pocillos, incluidos los de mayor concentración antibiótica.

4.2.- CÁLCULO DEL INÓCULO BACTERIANO A PARTIR DE MUESTRAS DE ORINA DIRECTA

Se seleccionaron cinco orinas positivas con un recuento de >100.000 ufc/ml en cultivo primario de distintas cepas de *E.coli*. Se realizaron 25 ensayos (5 ensayos/cepa) para determinar qué dilución de la muestra de orina proporciona un inóculo de aproximadamente $5,0 \times 10^4$ ufc/pocillo en el dispositivo POC-ITU.

Solo en un 20% (5/25) de los ensayos realizados, se consiguió un inóculo de aproximadamente 50.000 ufc en un volumen de 150 μ l, siendo ésta la dilución 1/500.

Para el resto de diluciones ensayadas, el inóculo en 150 µl fue muy superior a lo recomendado por la SEIMC.

Por tanto, la dilución 1/500 de la muestra de orina, y la posterior inoculación de 150 µl en el pocillo del dispositivo, proporciona un inóculo similar al recomendado por la SEIMC para estudios de sensibilidad antibiótica por microdilución en caldo.

Cepa	Microorganismo	Recuento en cultivo primario (ufc/placa)	Dilución 1/10 (ufc/placa)	Dilución 1/50 (ufc/placa)	Dilución 1/100 (ufc/placa)	Dilución 1/200 (ufc/placa)	Dilución 1/500 (ufc/placa)
68-66	<i>E.coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	375
67-22	<i>E.coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	300
75-61	<i>E.coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	350
77-73	<i>E.coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	300
82-78	<i>E.coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	320

Tabla 7. Recuento de microorganismos (ufc/placa) a las distintas diluciones de orina ensayadas.

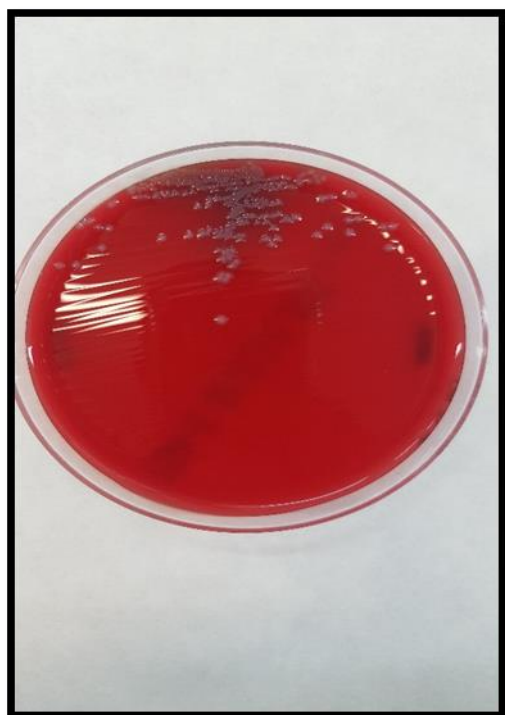


Figura 66. Recuento de aproximadamente 300 ufc/placa ($300.000 \text{ ufc/ml} \approx 5 \times 10^4 \text{ ufc/150 } \mu\text{l}$) tras una dilución 1/500 de la muestra de orina.

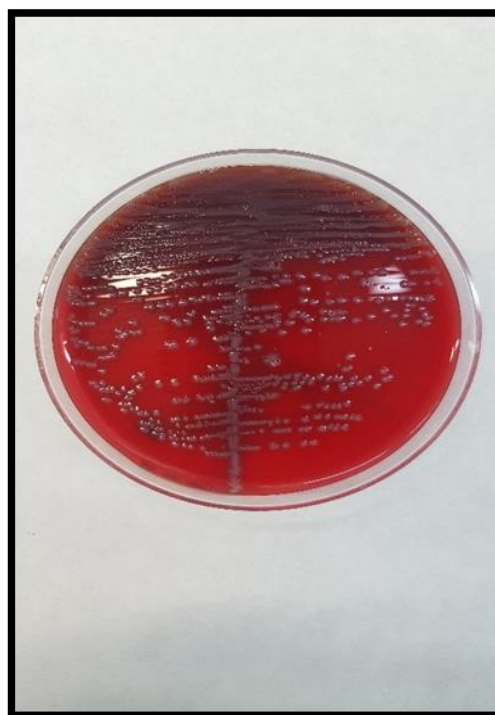


Figura 67. Recuento de aproximadamente 1000 ufc/placa ($>1.000.000 \text{ ufc/ml} \approx 150 \times 10^3 \text{ ufc/150 } \mu\text{l}$) tras una dilución 1/200 de la muestra de orina.

4.3.- IMPREGNACIÓN DEL DISPOSITIVO

4.3.1.- REACTIVOS UTILIZADOS EN EL PROCESO DE IMPREGNACIÓN

4.3.1.1.- Medios de cultivo. Resultados de los ensayos de productividad y pH

➤ **Resultados de los ensayos de productividad**

El rendimiento de las cepas de *E.coli* CECT 434 y *K.oxytoca* CECT 8207 se recoge en las siguientes tablas:

A) Escherichia coli CECT 434:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1	-	-	-	-	>300	108	10	1
TSA 2	-	-	-	-	>300	113	10	2
TSA 3	-	-	-	-	>300	110	8	2
TSA 4	-	-	-	-	>300	109	11	1
TSA 5	-	-	-	-	>300	115	9	2
Promedio	-	-	-	-	>300	111	9,6	1,6

B) Klebsiella oxytoca CECT 8207:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1	-	-	-	-	>300	86	8	1
TSA 2	-	-	-	-	>300	69	7	2
TSA 3	-	-	-	-	>300	75	12	0
TSA 4	-	-	-	-	>300	81	9	0
TSA 5	-	-	-	-	>300	79	10	1
Promedio	-	-	-	-	>300	78	9,2	0,8

De la lectura de las cinco placas de TSA por cada dilución ensayada, se verificó que la productividad de los medios de cultivo a concentración normal es satisfactoria.

Además, la productividad de los medios de cultivo a triple concentración también es satisfactoria, por lo que se confirmó que la concentración del medio deshidratado (x3)

en su preparación para reducir el volumen de inoculación, y en consecuencia, el tiempo de secado, es viable.

MEDIO DE CULTIVO	PRODUCTIVIDAD
BHI concentración normal	Satisfactoria
BHI triple concentrado	Satisfactoria
Caldo Mueller-Hinton concentración normal	Satisfactoria
Caldo Mueller-Hinton triple concentrado	Satisfactoria

➤ Resultados de los ensayos de pH

Los resultados de la medición del pH de los medios de cultivo a distintas condiciones de uso, se recogen en la siguiente tabla:

MEDIO DE CULTIVO	pH
BHI concentración normal	7,3
BHI triple concentrado	6,8
Mueller-Hinton concentración normal	7,2
Mueller-Hinton triple concentrado	7,1

No se observaron cambios drásticos del pH al concentrar los medios de cultivo, estando dentro de los márgenes habitualmente exigibles ($7,2 \pm 0,2$). Sin embargo, el caldo BHI triple concentrado presentó mayor variación ($\pm 0,5$). Por otro lado, destacar que el medio Mueller-Hinton presenta menos variación en comparación con el caldo BHI.

4.3.1.2.- Resultados de los ensayos con los distintos indicadores de crecimiento bacteriano

Resazurina

Se descartó la utilización de la resazurina tras comprobar que en el proceso de desecación se reducía (color rosa-fucsia) dicho compuesto, perdiendo la capacidad de revelar el crecimiento bacteriano.

Violeta de tetrazolio

En base a los resultados obtenidos en los ensayos iniciales con el violeta de tetrazolio a la concentración de uso definida por el fabricante, y la capacidad de conservar sus propiedades iniciales durante el proceso de impregnación, se confirmó como el sustrato idóneo para la detección colorimétrica de bacteriuria significativa y consecuentemente la resistencia de la bacteria a un determinado antibiótico en el dispositivo POC-ITU.

Además, se comprobó la dificultad de añadir el indicador de crecimiento bacteriano directamente al medio de cultivo debido al pequeño volumen de trabajo del mismo, originándose fenómenos de apelmazamiento y dificultando la disolución. Por ello, se determinó que la mejor opción era trabajar con una solución madre del indicador de crecimiento bacteriano y adicionar el volumen correspondiente al medio de cultivo líquido.

Finalmente, destacar que la solubilidad del indicador de crecimiento bacteriano en el medio Mueller-Hinton es mayor que en el medio BHI.

Fluoróforo MUG

Respecto al ensayo realizado con el fluoróforo MUG, el tiempo medio de detección de la fluorescencia en el método B fue de 6 horas. Los resultados de sensibilidad antibiótica utilizando el método A y el método B fueron coincidentes en todos los antibióticos analizados en 11 cepas (55%). En 1 cepa el sustrato fluorogénico no fue hidrolizado (resultados no interpretables), mientras que en las 8 cepas restantes se detectaron discrepancias: una en 1 cepa, dos en 6 cepas y tres en 1 cepa. El antibiótico que mayores resultados discordantes mostró fue cefuroxima. La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del método B para cada uno de los antibióticos estudiados, utilizando como *gold standard* el método A, se muestra en la tabla 8. La sensibilidad fue alta para cefotaxima, norfloxacino, fosfomicina, gentamicina, nitrofurantoína y cotrimoxazol. La especificidad fue excelente para ampicilina, fosfomicina y gentamicina, y nula para cefotaxima y nitrofurantoína. El VPP fue elevado en todos los casos. Una de las limitaciones del método B fue la falsa fluorescencia observada cuando se analizan antibióticos conteniendo un inhibidor de β -lactamasas.

ANTIBIÓTICO	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ampicilina	71	100	100	86,7
Cefuroxima	75	50	85,7	33,3
Cefotaxima	89,5	0	94,4	0
Norfloxacino	90,9	88,9	90,9	88,9
Fosfomicina	94,7	100	100	50
Gentamicina	100	100	100	100
Nitrofurantoína	100	0	95	100
Cotrimoxazol	100	85,7	92,9	100

Tabla 8. Descriptivos del método B para cada uno de los antibióticos estudiados.

La utilización del fluoróforo MUG en las pruebas de sensibilidad antibiótica permite acortar el tiempo de obtención de resultados. Sin embargo, los bajos porcentajes de sensibilidad y especificidad para algunos antibióticos, la emisión intrínseca de fluorescencia por parte de alguno de ellos y la necesidad de que cada microorganismo hidrolice un fluoróforo específico, descartaron la utilización de este reactivo como revelador de crecimiento bacteriano.

4.3.1.3.- Ensayos “*in vitro*” de los distintos antibióticos

➤ Ensayos con amoxicilina/ácido clavulánico

Ensayos con cepas de referencia

Para dicho ensayo, y con el fin de trabajar con las cepas de referencia (*Escherichia coli* CECT 434 y *Klebsiella oxytoca* CECT 8207) en fase estacionaria de crecimiento, se determinó el rendimiento de las mismas mediante la metodología anteriormente descrita.

El rendimiento de las cepas para este nuevo ensayo fue:

A) Escherichia coli CECT 434

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	>300	74	8	0
TSA 2-EC	-	-	-	-	>300	67	9	1
TSA 3-EC	-	-	-	-	>300	76	7	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	>300	69	6	1
TSA 5-EC	-	-	-	-	>300	72	8	0
Promedio	-	-	-	-	>300	71,6	7,6	0,4

B) Klebsiella oxytoca CECT 8207

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	>300	108	9	1
TSA 2-EC	-	-	-	-	>300	103	13	2
TSA 3-EC	-	-	-	-	>300	109	9	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	>300	97	12	0
TSA 5-EC	-	-	-	-	>300	102	10	1
Promedio	-	-	-	-	>300	103,8	10,6	0,8

Valor asignado a cada una de las columnas para *E. coli* CECT 434:

Valor asignado según placas TSA (ufc)		Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	
Inóculo 0.1 ml a $1/2 \cdot 10^{-3}$	36.000	Inóculo en $1/2 \cdot 10^{-3}$	54.000
Inóculo 0.1 ml a $1/3 \cdot 10^{-3}$	24.000	Inóculo en $1/3 \cdot 10^{-3}$	36.000
Inóculo 0.1 ml a $1/4 \cdot 10^{-3}$	18.000	Inóculo en $1/4 \cdot 10^{-3}$	27.000
Inóculo 0.1 ml a $1/5 \cdot 10^{-3}$	14.400	Inóculo en $1/5 \cdot 10^{-3}$	21.600
Inóculo 0.1 ml a 10^{-1} McFarland (0,5)	7.200.000	Inóculo en 10^{-1} McFarland (0,5)	10.800.000

Valor asignado a cada una de las columnas para *K. oxytoca* CECT 8207:

Valor asignado según placas TSA (ufc)		Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	
Inóculo 0.1 ml a $1/2 \cdot 10^{-3}$	52.000	Inóculo en $1/2 \cdot 10^{-3}$	78.000
Inóculo 0.1 ml a $1/3 \cdot 10^{-3}$	34.700	Inóculo en $1/3 \cdot 10^{-3}$	52.000
Inóculo 0.1 ml a $1/4 \cdot 10^{-3}$	26.000	Inóculo en $1/4 \cdot 10^{-3}$	39.000
Inóculo 0.1 ml a $1/5 \cdot 10^{-3}$	20.800	Inóculo en $1/5 \cdot 10^{-3}$	31.200
Inóculo 0.1 ml a 10^{-1} McFarland (0,5)	10.400.000	Inóculo en 10^{-1} McFarland (0,5)	15.600.000

A) *E.coli* CECT 434 (solución amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelada):

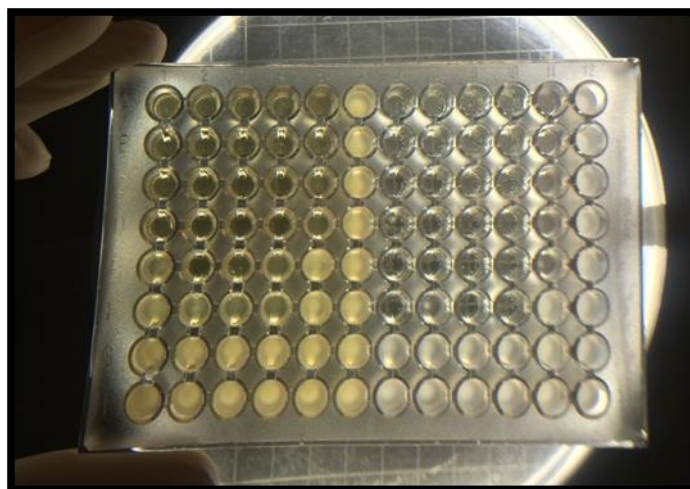


Figura 68. Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *E.coli* CECT 434.

Tras la visualización de los resultados, se obtiene una CMI para amoxicilina/ácido clavulánico en medio BHI (columnas 1 – 6) de 16 mg/l (columna 1). En cambio, se obtiene una CMI de 4 mg/l (columna 7) en medio Mueller-Hinton (columna 7 – 12).

A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
B	64	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
C	32	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
D	16	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
E	8	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
F	4	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB

Figura 69. Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *E.coli* CECT 434.

B) E.coli CECT 434 (solución amoxicilina/ácido clavulánico preparada *in situ*):

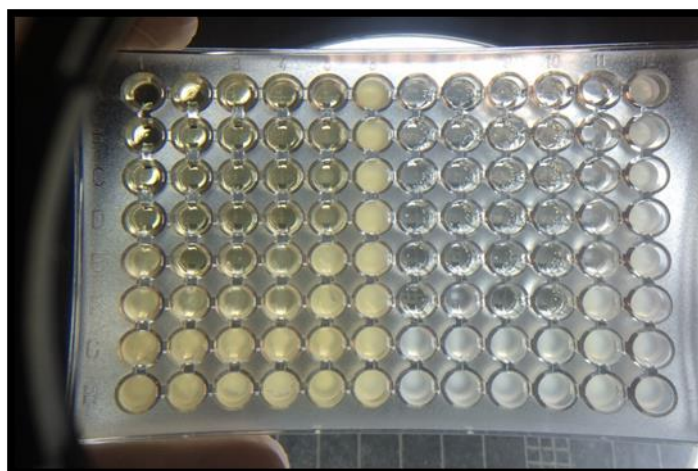


Figura 70. Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada *in situ* e inoculada con *E.coli* CECT 434.

Tras la visualización de los resultados, se obtiene una CMI para amoxicilina/ácido clavulánico en medio BHI (columnas 1 – 6) de 16 mg/l (columna 1). En cambio, se obtiene una CMI de 4 mg/l (columna 7) en medio Mueller-Hinton (columna 7 – 12).

A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
B	64	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
C	32	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
D	16	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
E	8	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
F	4	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		$\frac{1}{2} 10^{-3}$	$\frac{1}{3} 10^{-3}$	$\frac{1}{4} 10^{-3}$	$\frac{1}{5} 10^{-3}$	10^{-1}	Sin ATB	$\frac{1}{2} 10^{-3}$	$\frac{1}{3} 10^{-3}$	$\frac{1}{4} 10^{-3}$	$\frac{1}{5} 10^{-3}$	10^{-1}	Sin ATB

Figura 71. Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada *in situ* e inoculada con *E.coli* CECT 434.

C) *K.oxytoca* CECT 8207 (solución amoxicilina/ácido clavulánico previamente congelada):

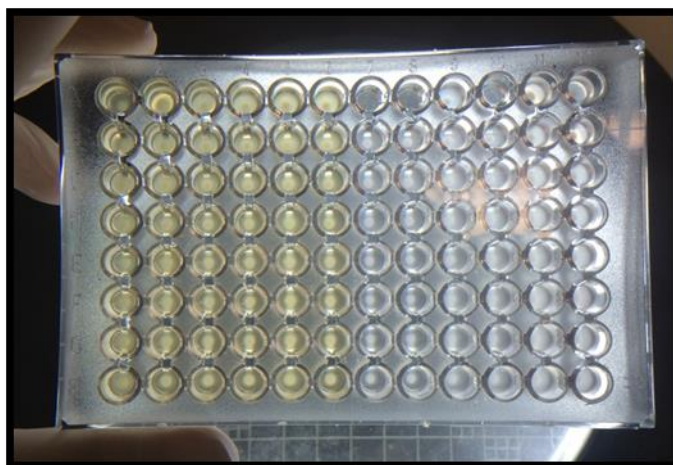


Figura 72. Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.

Tras la visualización de los resultados, se obtiene una CMI para amoxicilina/ácido clavulánico en medio BHI (columnas 1 – 6) de >128 mg/l (columna 1). En cambio, se obtiene una CMI de 128 mg/l (columna 7) en medio Mueller-Hinton (columna 7 – 12).

A	128	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
B	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB

Figura 73. Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.

D) *K.oxytoca* CECT 8207 (solución amoxicilina/ácido clavulánico preparación *in situ*):

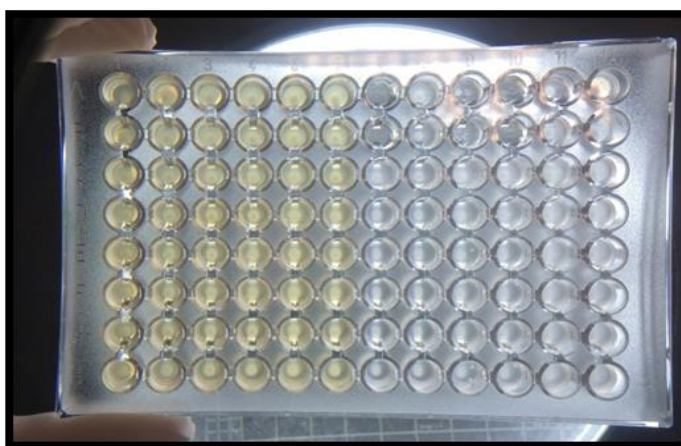


Figura 74. Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada *in situ* e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.

Tras la visualización de los resultados, se obtiene una CMI para amoxicilina/ácido clavulánico en medio BHI (columnas 1 – 6) de >128 mg/l (columna 1). En cambio, se obtiene una CMI de 64 mg/l (columna 7) en medio Mueller-Hinton (columna 7 – 12).

A	128	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
B	64	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
C	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻³	1/4 10 ⁻³	1/5 10 ⁻³	10 ⁻¹	Sin ATB

Figura 75. Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada *in situ* e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.

La congelación previa de la solución de trabajo del antibiótico, no afecta a la viabilidad del mismo, y por tanto, a la CMI real del microorganismo, ya que se obtienen prácticamente los mismos valores de concentración, que los ensayos efectuados con la solución preparada en el mismo momento de la impregnación del dispositivo. Por tanto, resulta viable trabajar con stocks de las soluciones de trabajo, almacenadas y conservadas en las condiciones descritas en el apartado “material y métodos”.

Por otro lado, se ha verificado que las condiciones de impregnación estándar definidas inicialmente, son viables, ya que no hay degradación del antibiótico durante el proceso de desecación, ni pérdida de actividad del resto de reactivos, pudiéndose definir la CMI del microorganismo y categorizar su sensibilidad según los criterios y puntos de corte establecidos por las distintas sociedades comúnmente reconocidas, especialmente *CLSI*.

Ensayos con cepas clínicas

1- Escherichia coli 11-00

Rendimiento de la cepa en fase estacionaria:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	-	43	5	0
TSA 2-EC	-	-	-	-	-	32	6	1
TSA 3-EC	-	-	-	-	-	36	5	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	-	45	4	0
TSA 5-EC	-	-	-	-	-	42	5	0
Promedio	-	-	-	-	-	39,6	5	0,2

Valor asignado al inóculo del pocillo y correlación con su concentración en orina:

	Valor asignado en placas TSA (ufc)	Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	Valor representativo en muestra de orina (ufc/ml)	CMI teórica (mg/l), CMI* experimental (mg/l) y tiempo de viraje del control negativo en MH
Inóculo 1/2 10⁻³	13500	20250	67.500.000	CMI: 8 mg/l; CMI*: 16 mg/l; Halo: 19 mm
Inóculo 1/3 10⁻⁵	135	203	670.000	
Inóculo 1/3 10⁻⁶	14	20	67.500	7 horas / Sin viraje
Inóculo 1/2 10⁻⁷	2.5	3.75	12.500	7 horas / Sin viraje
Inóculo 10⁻⁸	0.2	0.3	2.000	

Esquema de distribución a las 7 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E	8	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
F	4	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
G	2	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
H	1	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

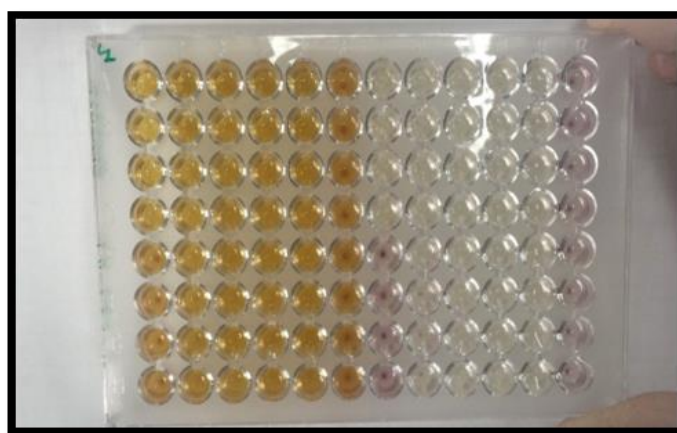


Figura 76. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 11-00 a las 7 horas de incubación.

Resultados a las 7 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 16 mg/l (intermedio) tanto en Mueller-Hinton, como en BHI. Es decir, una dilución mayor a la obtenida por el método de referencia.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene una interpretación discordante en cuanto a la sensibilidad del antimicrobiano, ya que este método categoriza la bacteria como sensible.
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (<10.000 ufc/ml - **control negativo**) permanece negativo, sin viraje del medio al tiempo de lectura. Por otro lado, la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento >100.000 ufc/ml, presenta viraje del medio.

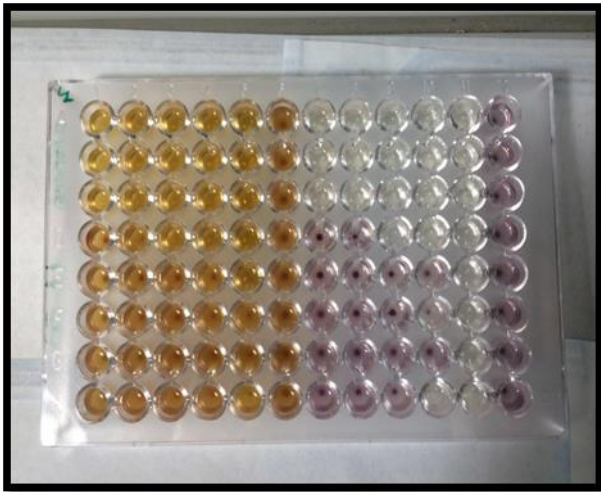


Figura 77. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 11-00 a las 10 y 12 horas de incubación.

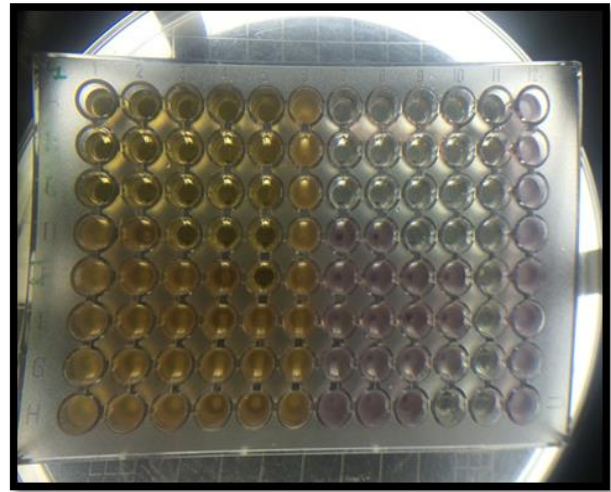


Figura 78. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 11-00 a las 22 horas de incubación.

Esquema de distribución a las 22 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
E	8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

Resultados a las 22 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 32 mg/l (resistente) tanto en Mueller-Hinton, como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene una interpretación discordante en cuanto a la sensibilidad del antimicrobiano, ya que este método categoriza la bacteria como sensible.
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (<10.000 ufc/ml - **control negativo**) se ha positivizado (viraje del medio) en el medio BHI, sin embargo, en el medio Mueller-Hinton no hay viraje. Por otro lado, las columnas con inóculos representativos de orinas con recuento significativo, presentan viraje del medio.

2- Escherichia coli 15-28

Rendimiento de la cepa en fase estacionaria:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	-	86	9	1
TSA 2-EC	-	-	-	-	-	78	8	1
TSA 3-EC	-	-	-	-	-	82	8	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	-	74	7	1
TSA 5-EC	-	-	-	-	-	80	8	0
Promedio	-	-	-	-	-	80	8	0,6

Valor asignado al inóculo del pocillo y correlación con su concentración en orina:

	Valor asignado en placas TSA (ufc)	Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	Valor representativo en muestra de orina (ufc/ml)	CMI teórica (mg/l), CMI* experimental (mg/l) y tiempo de viraje del control negativo en MH
Inóculo 1/2 10⁻³	27.000	40.500	135.000.000	CMI: 16 mg/l; CMI*: 16 mg/l; Halo: 11 mm
Inóculo 1/3 10⁻⁵	270	405	1.350.000	
Inóculo 1/3 10⁻⁶	27	41	135.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 1/2 10⁻⁷	4	6	20.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 10⁻⁸	0.6	0.9	3.000	

Esquema de distribución a las 7 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E	8	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
F	4	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
G	2	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
H	1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

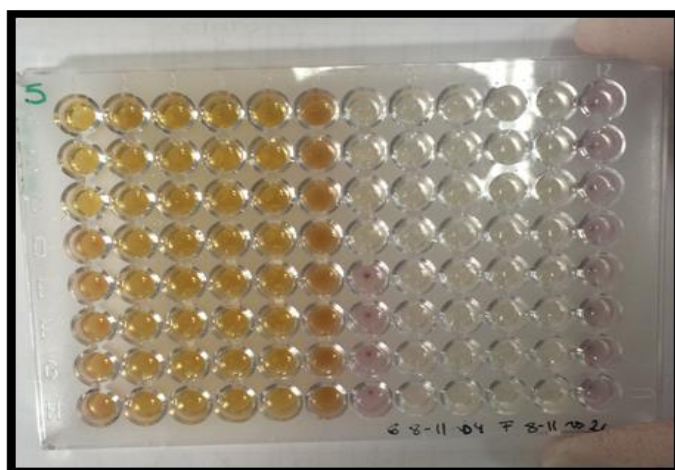


Figura 79. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 15-28 a las 7 horas de incubación.

Resultados a las 7 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 16 mg/l (intermedio) en Mueller-Hinton, coincidiendo con el método de referencia. En cambio, se obtiene una CMI de 32 mg/l (resistente) en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene una interpretación discordante en cuanto a la sensibilidad del antimicrobiano en Mueller-Hinton, ya que este último, indica que la bacteria es intermedia al antibiótico testado y el método de difusión disco-placa resistente. Los resultados obtenidos en BHI coinciden con los resultados del antibiograma disco-placa.
- A este tiempo de lectura, hay una diferencia de ± 1 dilución entre el BHI y el Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) permanece negativo, sin viraje del medio al tiempo de lectura. Por otro lado, las columnas con un inóculo representativo de orinas con recuento significativo tampoco presentan viraje del medio.



Figura 80. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 15-28 a las 10 - 12 horas de incubación.

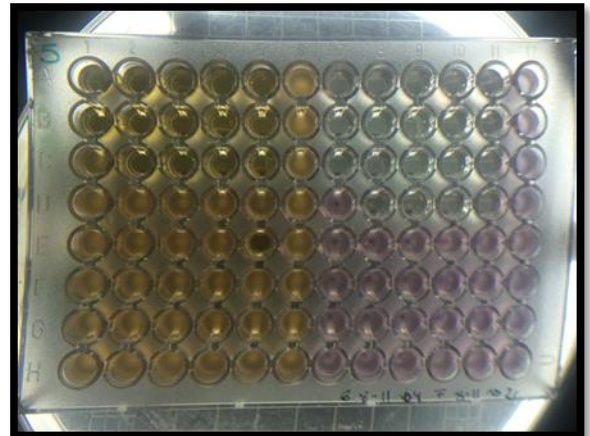


Figura 81. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 15-28 a las 22 horas de incubación.

Esquema de distribución a las 22 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
E	8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

Resultados a las 22 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 64 mg/l (resistente) en BHI y 32 mg/l (resistente) en Mueller-Hinton.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (resistente).
- A este tiempo de lectura, hay una diferencia de una dilución entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) se ha positivizado (viraje del medio) en el medio BHI y en Mueller-Hinton. Por otro lado, las columnas con un inóculo representativo de orinas con recuento significativo, presentan viraje del medio.

3- Escherichia coli 54-11

Rendimiento de la cepa en fase estacionaria:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	-	63	5	0
TSA 2-EC	-	-	-	-	-	58	7	0
TSA 3-EC	-	-	-	-	-	60	5	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	-	54	6	1
TSA 5-EC	-	-	-	-	-	50	6	0
Promedio	-	-	-	-	-	57	5,8	0,2

Valor asignado al inóculo del pocillo y correlación con su concentración en orina:

	Valor asignado en placas TSA (ufc)	Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	Valor representativo en muestra de orina (ufc/ml)	CMI teórica (mg/l), CMI* experimental (mg/l) y tiempo de viraje del control negativo en MH
Inóculo 1/2 10⁻³	19.000	28.500	95.000.000	CMI: 16 mg/l; CMI*: 16 mg/l; Halo: 13 mm
Inóculo 1/3 10⁻⁵	190	285	950.000	
Inóculo 1/3 10⁻⁶	19	29	95.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 1/2 10⁻⁷	3	5	17.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 10⁻⁸	0.2	0.3	3.000	

Esquema de distribución a las 7 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton						
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
D	16	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
E	8	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
F	4	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
G	2	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
H	1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	

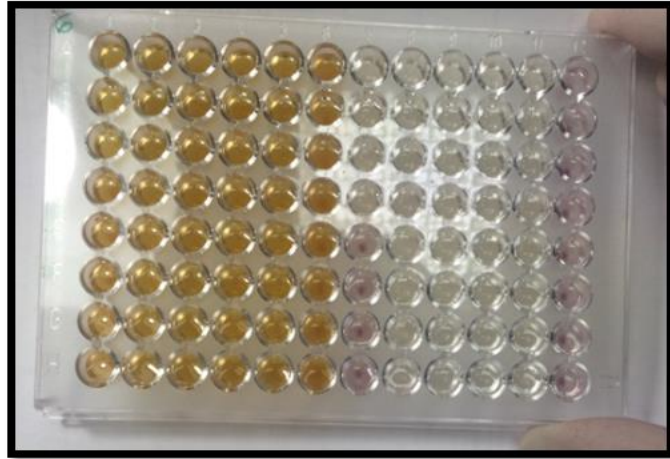


Figura 82. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 54-11 a las 7 horas de incubación.

Resultados a las 7 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 16 mg/l (intermedio) en Mueller-Hinton, coincidiendo con el método de referencia. En cambio, se obtiene una CMI de 32 mg/l (resistente) en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene una interpretación discordante en cuanto a la sensibilidad del antimicrobiano en Mueller-Hinton, ya que, este último indica que la bacteria es intermedia al antibiótico testado y el método de difusión disco-placa resistente. Los resultados obtenidos en BHI coinciden con los resultados del antibiograma disco-placa.
- A este tiempo de lectura, hay una diferencia de una dilución entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) permanece negativo, sin viraje del medio al tiempo de lectura. Por otro lado, las columnas con un inóculo representativo de orinas con recuento significativo, tampoco presentan viraje del medio.



Figura 83. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 54-11 a las 10 - 12 horas de incubación.

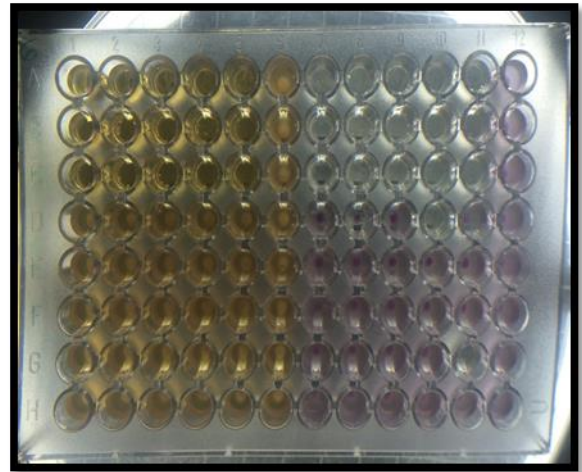


Figura 84. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 54-11 a las 22 horas de incubación.

Esquema de distribución a las 22 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

Resultados a las 22 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 32 mg/l (resistente) tanto en Mueller-Hinton como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (resistente).
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) se ha positivizado (viraje del medio) en el medio BHI y en Mueller-Hinton. Lo mismo ocurre con los pocillos de las columnas con inóculos representativos de orinas con recuento significativo.

4- Escherichia coli 10-04

Rendimiento de la cepa en fase estacionaria:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	-	70	6	0
TSA 2-EC	-	-	-	-	-	77	8	1
TSA 3-EC	-	-	-	-	-	65	4	1
TSA 4-EC	-	-	-	-	-	72	9	0
TSA 5-EC	-	-	-	-	-	68	8	0
Promedio	-	-	-	-	-	70,4	7	0,4

Valor asignado al inóculo del pocillo y correlación con su concentración en orina:

	Valor asignado en placas TSA (ufc)	Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	Valor representativo en muestra de orina (ufc/ml)	CMI teórica (mg/l), CMI* experimental (mg/l) y tiempo de viraje del control negativo en MH
Inóculo 1/2 10 ⁻³	23.000	34.500	115.000.000	CMI: 4 mg/l; CMI*: 2 mg/l; Halo: 19 mm
Inóculo 1/3 10 ⁻⁵	230	345	1.150.000	
Inóculo 1/3 10 ⁻⁶	23	35	117.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 1/2 10 ⁻⁷	3.5	5	17.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 10 ⁻⁸	0.4	0.6	2.000	

Esquema de distribución a las 7 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E	8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F	4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
G	2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
H	1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

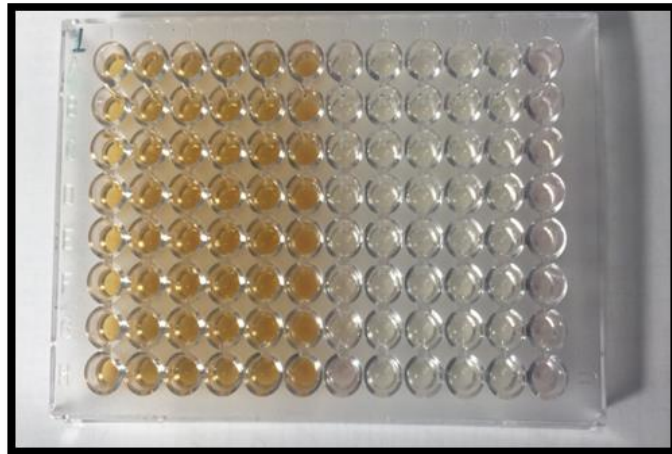


Figura 85. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-04 a las 7 horas de incubación.

Resultados a las 7 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 2 mg/l (sensible) tanto en Mueller-Hinton como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (sensible).
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) permanece negativo, sin viraje del medio al tiempo de lectura. Por otro lado, las columnas con inóculos representativos de orinas con recuento significativo, tampoco presentan viraje del medio.

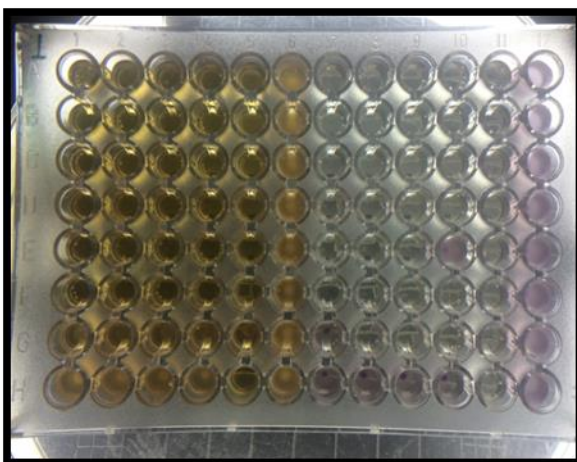


Figura 86. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-04 a las 10 - 12 horas de incubación.

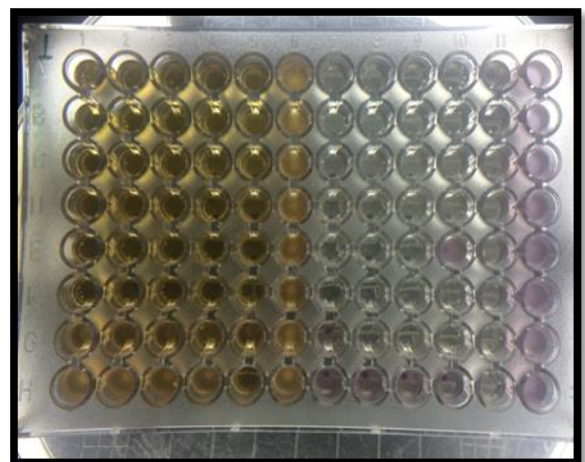


Figura 87. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-04 a las 22 horas de incubación.

Esquema de distribución a las 22 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E	8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F	4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

Resultados a las 22 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 4 mg/l (sensible) tanto en Mueller-Hinton, como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (sensible).
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) se ha positivizado (viraje del medio) en el medio BHI, pero no en Mueller-Hinton. Por otro lado, las columnas con inóculos representativos de orinas patológicas, presentan viraje del medio.

5- Escherichia coli 10-75

Rendimiento de la cepa en fase estacionaria:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	-	65	3	0
TSA 2-EC	-	-	-	-	-	57	5	0
TSA 3-EC	-	-	-	-	-	61	7	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	-	70	6	1
TSA 5-EC	-	-	-	-	-	62	7	1
Promedio	-	-	-	-	-	63	5,6	0,4

Valor asignado al inóculo del pocillo y correlación con su concentración en orina:

	Valor asignado en placas TSA (ufc)	Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	Valor representativo en muestra de orina (ufc/ml)	CMI teórica (mg/l), CMI* experimental (mg/l) y tiempo de viraje del control negativo en MH
Inóculo 1/2 10 ⁻³	21.000	31.500	105.000.000	CMI: 4 mg/l; CMI*: 8 mg/l; Halo: 16 mm
Inóculo 1/3 10 ⁻⁵	210	315	1.050.000	
Inóculo 1/3 10 ⁻⁶	21	32	105.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 1/2 10 ⁻⁷	3	5	17.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 10 ⁻⁸	0.4	0.6	2.000	

Esquema de distribución a las 7 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E	8	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
F	4	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
G	2	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
H	1	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

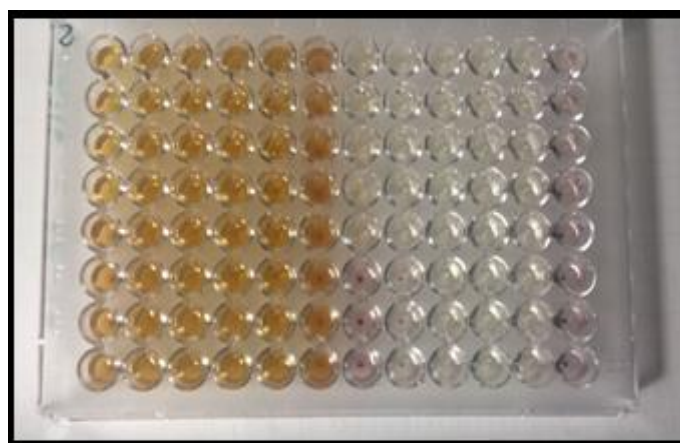


Figura 88. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-75 a las 7 horas de incubación.

Resultados a las 7 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 8 mg/l (sensible) en Mueller-Hinton. En cambio, se obtiene una CMI de 16 mg/l (intermedio) en BHI.

- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene una interpretación discordante en cuanto a la sensibilidad del antimicrobiano en Mueller-Hinton, ya que, este último indica que la bacteria es sensible al antibiótico y el método de difusión disco-placa intermedio. Los resultados obtenidos en BHI coinciden con los resultados del antibiograma disco-placa.
- A este tiempo de lectura, hay una diferencia de una dilución entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) permanece negativo, sin viraje del medio al tiempo de lectura. Por otro lado, la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de >100.000 ufc/ml presenta viraje del medio tanto en BHI como Mueller-Hinton.

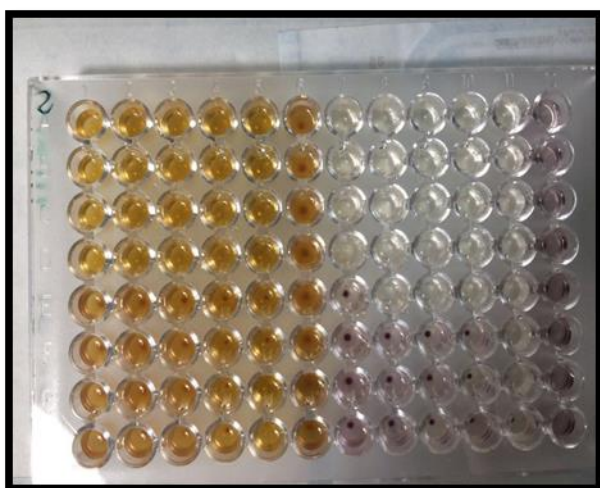


Figura 89. Resultados del antibiograma de la cepa de *E. coli* 10-75 a las 10 - 12 horas de incubación.

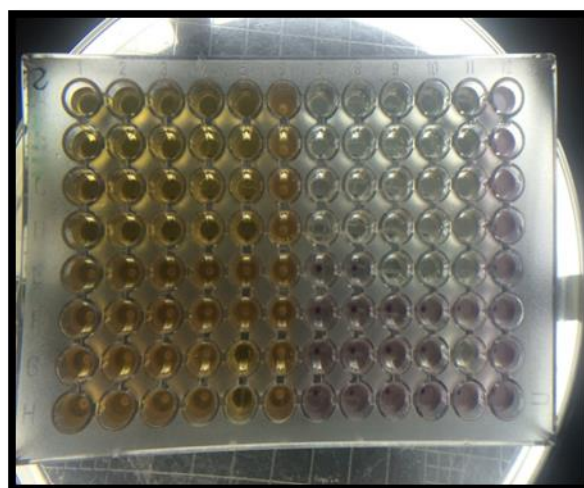


Figura 90. Resultados del antibiograma de la cepa de *E. coli* 10-75 a las 22 horas de incubación.

Esquema de distribución a las 22 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E	8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	10^{-8}	Sin Atb.	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	10^{-8}	Sin Atb.

Resultados a las 22 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 16 mg/l (intermedio) tanto en Mueller-Hinton, como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (intermedio).
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) se ha positivizado (viraje del medio) en el medio BHI y en Mueller-Hinton. Por otro lado, las columnas con inóculos representativos de orinas con recuento significativo, presentan viraje del medio.

6- Escherichia coli 79-17

Rendimiento de la cepa en fase estacionaria:

	1E-1	1E-2	1E-3	1E-4	1E-5	1E-6	1E-7	1E-8
TSA 1-EC	-	-	-	-	-	52	5	0
TSA 2-EC	-	-	-	-	-	55	5	0
TSA 3-EC	-	-	-	-	-	47	4	0
TSA 4-EC	-	-	-	-	-	60	8	0
TSA 5-EC	-	-	-	-	-	57	7	1
Promedio	-	-	-	-	-	54	5,8	0,2

Valor asignado al inóculo del pocillo y correlación con su concentración en orina:

	Valor asignado en placas TSA (ufc)	Valor asignado en 150 µl (ufc/pocillo)	Valor representativo en muestra de orina (ufc/ml)	CMI teórica (mg/l), CMI* experimental (mg/l) y tiempo de viraje del control negativo en MH
Inóculo 1/2 10 ⁻³	18.000	27.000	90.000.000	CMI: 16 mg/l; CMI*: 32 mg/l; Halo: 10 mm
Inóculo 1/3 10 ⁻⁵	180	270	900.000	
Inóculo 1/3 10 ⁻⁶	18	27	90.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 1/2 10 ⁻⁷	3	5	17.000	7 horas / Sin viraje
Inóculo 10 ⁻⁸	0.2	0.3	1.000	

Esquema de distribución a las 7 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
E	8	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
F	4	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
G	2	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
H	1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

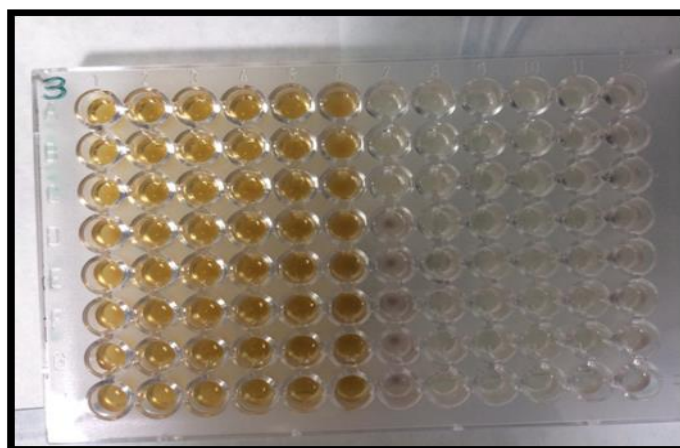


Figura 91. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 79-17 a las 7 horas de incubación.

Resultados a las 7 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 32 mg/l (resistente) tanto en Mueller-Hinton como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (resistente).
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) permanece negativo, sin viraje del medio al tiempo de lectura. Por otro lado, las columnas con un inóculo representativo de una orina con recuento significativo no presentan tampoco viraje del medio.

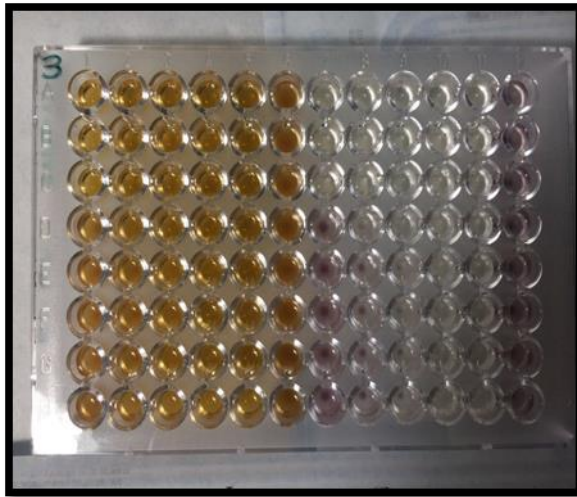


Figura 92. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 79-17 a las 10 - 12 horas de incubación.

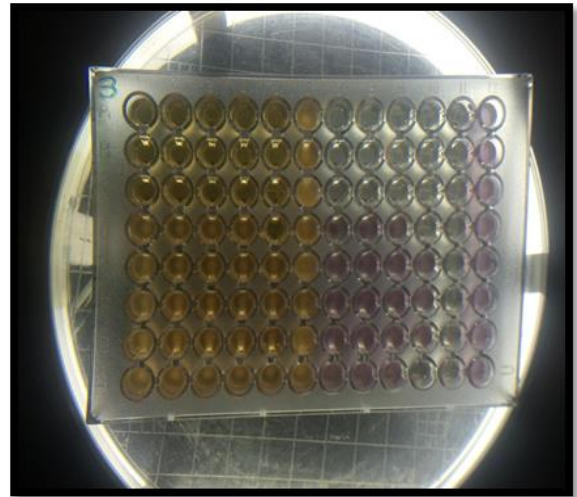


Figura 93. Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 79-17 a las 22 horas de incubación.

Esquema de distribución a las 22 horas:

FILA	CMI	Brain Heart Infusion						Mueller Hinton					
A	128	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
B	64	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
C	32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
D	16	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
E	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
F	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
G	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Sin Atb.

Resultados a las 22 horas de incubación:

- Se obtiene una CMI experimental de 32 mg/l (resistente) tanto en Mueller-Hinton, como en BHI.
- En comparación con el antibiograma disco-placa, se obtiene la misma interpretación (resistente).
- A este tiempo de lectura, no hay diferencias entre los resultados obtenidos en BHI y Mueller-Hinton.
- La columna con el inóculo representativo de una orina no patológica (**control negativo**) se ha positivizado (viraje del medio) en el medio BHI, pero no en Mueller-Hinton. Por otro lado, las columnas con inóculos representativos de orinas con recuento significativo, presentan viraje del medio.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos tras el segundo ensayo con amoxicilina/ácido clavulánico y cepas clínicas de *E.coli*:

Cepa	CMI (mg/l) teórica por método de referencia	Difusión disco-placa	CMI (mg/l) experimental 7 horas/MH	CMI (mg/l) experimental 7 horas/BHI	Controles negativos MH/BHI	CMI (mg/l) experimental 22 horas/MH	CMI (mg/l) experimental 22 horas/BHI	Controles negativos MH/BHI
11-00	8	S	16	16	-/-	32	32	-/+
15-28	16	R	16	32	-/-	32	64	+/+
54-11	16	R	16	32	-/-	32	32	+/+
10-04	4	S	2	2	-/-	4	4	-/+
10-75	4	I	8	16	-/-	16	16	+/+
79-17	16	R	32	32	-/-	32	32	-/+

Se verificó la validez del dispositivo en las condiciones de impregnación descritas en el apartado “material y métodos” para este ensayo, ya que al comparar los resultados de CMI y la categoría de sensibilidad (sensible, intermedio o resistente) entre los métodos de referencia (microdilución y disco-placa) y el dispositivo, los resultados son equivalentes en la mayoría de los casos.

En caso de categorizar las cepas intermedias a amoxicilina/ácido clavulánico como resistentes, el grado de correlación entre el método de referencia y el dispositivo, sería del 83,3% en Mueller-Hinton y de un 66,6% en BHI para los ensayos por microdilución. Por otro lado, se observó que el grado de correlación entre los ensayos por microdilución del dispositivo, y el método de referencia difusión disco-placa, es mayor cuando se utiliza el BHI como medio de cultivo (83,3% vs 66,6%).

Aunque los medios de cultivo son productivos en las condiciones anteriormente descritas, no son equivalentes. El medio de cultivo BHI es más productivo que el Mueller-Hinton, ya que trabajando en ambos medios a la misma concentración antibiótica, no se obtiene la misma CMI. Los resultados obtenidos en medio Mueller-Hinton, presentan un alto grado de concordancia con los valores de CMI determinados por microdilución, técnica de referencia para caracterizar la susceptibilidad antibiótica de la mayoría de microorganismos. Es por ello, que siguiendo las referencias bibliográficas del *CLSI*, que están definidas para las pruebas desarrolladas en Mueller-Hinton, los resultados no son adecuados para BHI.

Por otro lado, la visualización macroscópica de los resultados en medio Mueller-Hinton es relativamente mejor que en BHI.

Además, en el caso de impregnar el pocillo con una concentración de antibiótico, una dilución mayor, a la del punto de corte que define la categoría de intermedio, originará que aquellas cepas con una sensibilidad intermedia, no viren el medio y se consideren sensibles (error mayor).

Por el contrario, la impregnación con la concentración de antibiótico correspondiente al CMI teórico, evitaría que las cepas caracterizadas como intermedias, se consideren sensibles.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos en este ensayo, la concentración de antibiótico a impregnar en los pocillos sería la correspondiente a la sensibilidad teórica del antibiótico según las guías bibliográficas. No obstante, esto puede estar sujeto a variaciones según el tipo de antibiótico y los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*.

➤ Ensayos del resto de antibióticos

Ensayos con cepas clínicas

1) Amoxicilina/ácido clavulánico

El perfil de sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico de los microorganismos testados en este ensayo se resume en la siguiente tabla:

Cepa (nº referencia)	CMI (mg/l)	Interpretación CMI	Disco-placa (mm)	Interpretación Disco-placa
15-28	16	I	11	R
54-11	16	I	13	R
10-04	4	S	19	S
10-75	4	S	16	I
10-17	>16	R	0	R
54-08	>32	R	10	R

Tabla 9. Perfil de sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

Los puntos de corte establecidos por *CLSI* para determinar la sensibilidad del grupo de enterobacterias a amoxicilina/ácido clavulánico, se muestran en la siguiente tabla:

Guía CLSI	Sensible	Intermedio	Resistente
Amoxicilina/ác. clavulánico	≤ 8 mg/l	16 mg/l	≥ 32 mg/l

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

AMC		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
B	128	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
C	64	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
D	32	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
E	16	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
F	8	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
G	4	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
H	2	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: <2				Resistente: 32				Resistente: >256			

AMC		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
B	128	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
C	64	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D	32	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E	16	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
F	8	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
G	4	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
H	2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Intermedio: 16				Resistente: 32				Resistente: 32			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación, se puede definir la CMI real de cada una de las cepas, para el inóculo de referencia en estudios de microdilución ($1/2 \cdot 10^{-3}$).

A este tiempo de lectura, en la cepa 10-04 no hay viraje de los pocillos de ninguna de las columnas con inóculos de $1/3 \cdot 10^{-5}$ y $1/3 \cdot 10^{-6}$, es decir, orinas con recuentos de $>10^5$ ufc/ml y 10^5 ufc/ml respectivamente. Además, no hay viraje de los pocillos de la columna con un inóculo de $1/2 \cdot 10^{-7}$ (10.000 ufc/ml – 100.000 ufc/ml) en ninguna de las cepas.

En 5/6 (83,3%) de las cepas, han virado los pocillos de la columna correspondiente a orinas con un recuento bacteriano $>10^5$ ufc/ml. La única cepa en la que además, han virado los pocillos de la columna representativa de una orina con recuento de 10^5 ufc/ml, es la 10-75.

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

AMC		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
B	128	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
C	64	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
D	32	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
E	16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G	4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H	2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$
Interpretación		Sensible: <2				Resistente: 32				Resistente: >256			

AMC		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
B	128	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
C	64	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
D	32	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
E	16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$
Interpretación		Intermedio: 16				Resistente: 32				Resistente: 32			

A las 9 horas y 30 minutos de incubación, en 4/6 (66,6%) de las cepas han virado también los controles correspondientes a orinas con un recuento de $1/2 \cdot 10^{-7}$ (10.000 ufc/ml – 100.000 ufc/ml).

Comparación de los resultados de CMI obtenidos mediante el dispositivo y las técnicas de difusión disco-placa y microdilución.

Cepa	CMI dispositivo AMC	Difusión disco-placa	Coincide	CMI microdilución	Coincide
15 - 28	R	R	Sí	I	No
54 - 11	R	R	Sí	S	No
10 - 04	S	S	Sí	S	Sí
10 - 75	I	I	Sí	I	Sí
10 - 17	R	R	Sí	R	Sí
54 - 08	R	R	Sí	R	Sí

Tabla 10. Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con amoxicilina/ácido clavulánico.

2) Fosfomicina

El perfil de sensibilidad a fosfomicina de los microorganismos testados en este ensayo se resume en la siguiente tabla:

Cepa (n° referencia)	CMI (mg/l)	Interpretación CMI	Disco-placa (mm)	Interpretación Disco-placa
15-28	32	S	21	S
54-11	<16	S	23	S
10-04	<16	S	21	S
10-75	<16	S	24	S
10-17	32	S	18	S
54-08	<16	S	16	S

Tabla 11. Perfil de sensibilidad a fosfomicina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

Los puntos de corte establecidos por CLSI para determinar la sensibilidad del grupo de enterobacterias a fosfomicina, se muestran en la siguiente tabla:

Guía CLSI	Sensible	Intermedio	Resistente
Fosfomicina	≤ 64 mg/l	128 mg/l	≥ 256 mg/l

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

FOS		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
B	128	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
C	64	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
D	32	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
E	16	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
F	8	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
G	4	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
H	2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: 4				Sensible: 4				Sensible: 4			

FOS		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B	128	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C	64	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D	32	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
E	16	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F	8	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
G	4	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
H	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Resistente: > 256				Sensible: 16				Sensible: 16			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación, se puede definir la CMI real de cada uno de los microorganismos sometidos a ensayo.

En la cepa 54-11 han virado todos los controles, incluidos los representativos de inóculos correspondientes a orinas con recuentos de $\frac{1}{2} 10^{-7}$ (10.000 ufc/ml – 100.000 ufc/ml).

Destaca, en la cepa 54-08, que a este tiempo de lectura, no han virado los pocillos de ninguna columna, a excepción, de la columna representativa de la CMI real del microorganismo.

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

FOS		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
B	128	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
C	64	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
D	32	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
E	16	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
F	8	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
G	4	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
H	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 10^{-3}$	$1/3 10^{-5}$	$1/3 10^{-6}$	$1/2 10^{-7}$	$1/2 10^{-3}$	$1/3 10^{-5}$	$1/3 10^{-6}$	$1/2 10^{-7}$	$1/2 10^{-3}$	$1/3 10^{-5}$	$1/3 10^{-6}$	$1/2 10^{-7}$
Interpretación		Sensible: 8				Sensible: 4				Sensible: 4			

FOS		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
B	128	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
C	64	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
D	32	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
E	16	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
F	8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
H	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 10^{-3}$	$1/3 10^{-5}$	$1/3 10^{-6}$	$1/2 10^{-7}$	$1/2 10^{-3}$	$1/3 10^{-5}$	$1/3 10^{-6}$	$1/2 10^{-7}$	$1/2 10^{-3}$	$1/3 10^{-5}$	$1/3 10^{-6}$	$1/2 10^{-7}$
Interpretación		Resistente: ≥ 256				Sensible: 16				Sensible: 16			

A las 9 horas y 30 minutos de incubación, la CMI real se mantiene igual respecto a la última lectura, a excepción, de la cepa 10-04, que ha aumentado una dilución.

En 3/6 de las cepas (50%) han virado los controles correspondientes a orinas con recuentos de $10^5 - 10^4$ ufc/ml.

Por otro lado, a este tiempo de incubación, la CMI de la cepa 10-75 no coincide con la CMI real determinada por el método de referencia.

Comparación de los resultados de CMI obtenidos mediante el dispositivo y las técnicas de difusión disco-placa y microdilución.

Cepa	CMI dispositivo FOS	Difusión disco-placa	Coincide	CMI microdilución	Coincide
15 - 28	S	S	Sí	S	Sí
54 - 11	S	S	Sí	S	Sí
10 - 04	S	S	Sí	S	Sí
10 - 75	R	S	No	S	No
10 - 17	S	S	Sí	S	Sí
54 - 08	S	S	Sí	S	Sí

Tabla 12. Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con fosfomicina.

3) Ciprofloxacino

El perfil de sensibilidad a ciprofloxacino de los microorganismos testados en este ensayo se resume en la siguiente tabla:

Cepa (nº referencia)	CMI (mg/l)	Interpretación CMI	Disco-placa (mm)	Interpretación Disco-placa
15-28	>4	R	8	R
54-11	<0.25	S	25	S
10-04	<0.25	S	27	S
10-75	>4	R	0	R
10-17	<0.5	S	25	S
54-08	>4	R	9	R

Tabla 13. Perfil de sensibilidad a ciprofloxacino de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

Los puntos de corte establecidos por *CLSI* para determinar la sensibilidad del grupo de enterobacterias a ciprofloxacino, se muestran en la siguiente tabla:

Guía CLSI	Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacino	≤ 0.06 mg/l	0.12 – 0.5 mg/l	≥ 1 mg/l

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

CIP		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	8	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B	4	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C	2	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D	1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
E	0.5	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
F	0.25	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
G	0.12	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
H	0.06	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: <0.06				Resistente: 1				Sensible: <0.06			

CIP		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	8	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B	4	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C	2	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D	1	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
E	0.5	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
F	0.25	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
G	0.12	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
H	0.06	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Resistente: >8				Resistente: >8				Resistente: 2			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación, se puede definir la CMI real de cada uno de los microorganismos sometidos a ensayo.

En cuanto a las cepas 10-04, 54-11, 15-28 y 10-75, ya han virado los pocillos de las columnas correspondientes a orinas con recuentos de $>10^5$ ufc/ml. Además, en la cepa 10-75, han virado también los pocillos de la columna correspondiente a una orina con recuento de 10^5 ufc/ml. En cambio, en las cepas 10-17 y 54-08, no han virado aún los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento $>10^5$ ufc/ml.

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

CIP		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	8	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
B	4	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
C	2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
D	1	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
E	0.5	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
F	0.25	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
G	0.12	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
H	0.06	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: <0.06				Resistente: 1				Sensible: 0.06			

CIP		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
B	4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
C	2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
D	1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
E	0.5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
F	0.25	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
G	0.12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
H	0.06	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Resistente: >8				Resistente: >8				Resistente: 2			

A este tiempo de lectura se mantiene la CMI real de cada una de las cepas. Además, han virado todos los pocillos de las columnas representativas de orinas con un recuento de $>10^5$ ufc/ml y 10^5 ufc/ml. En 3/6 (50%) de las cepas, han virado los pocillos de las columnas con inóculos representativos de orinas con una carga bacteriana de 10^5 ufc/ml – 10^4 ufc/ml.

Comparación de los resultados de CMI obtenidos mediante el dispositivo y las técnicas de difusión disco-placa y microdilución.

Cepa	CMI dispositivo CIP	Difusión disco-placa	Coincide	CMI microdilución	Coincide
15 - 28	R	R	Sí	R	Sí
54 - 11	R	S	No	S	No
10 - 04	S	S	Sí	S	Sí
10 - 75	R	R	Sí	R	Sí
10 - 17	S	S	Sí	S	Sí
54 - 08	R	R	Sí	R	Sí

Tabla 14. Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con ciprofloxacino.

4) Ampicilina

El perfil de sensibilidad a ampicilina de los microorganismos testados en este ensayo se resume en la siguiente tabla:

Cepa (n° referencia)	CMI (mg/l)	Interpretación CMI	Disco-placa (mm)	Interpretación Disco-placa
15-28	≥ 32	R	0	R
54-11	≥ 32	R	0	R
10-04	≤ 2	S	21	S
10-75	≥ 32	R	0	R
10-17	≥ 32	R	0	R
54-08	≥ 32	R	0	R

Tabla 15. Perfil de sensibilidad a ampicilina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

Los puntos de corte establecidos por *CLSI* para determinar la sensibilidad del grupo de enterobacterias a ampicilina, se muestran en la siguiente tabla:

Guía CLSI	Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	≤ 8 mg/l	16 mg/l	≥ 32 mg/l

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

AMP		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
B	128	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
C	64	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
D	32	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
E	16	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
F	8	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
G	4	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
H	2	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: <2				Resistente: >256				Resistente: >256			

AMP		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
B	128	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
C	64	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
D	32	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
E	16	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
F	8	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
G	4	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
H	2	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Resistente: 128				Resistente: >256				Resistente: >256			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación, se puede definir la CMI real de cada uno de los microorganismos sometidos a ensayo.

En todas las cepas, a excepción de la 54-08, han virado todos los pocillos de las columnas representativas de orinas con recuento de $>10^5$ ufc/ml. Solo en dos cepas (54-11 y 10-75) han virado los pocillos de la columna correspondiente a orinas con un inóculo de 10^5 ufc/ml.

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

AMP		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B	128	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
C	64	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
D	32	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
E	16	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
F	8	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G	4	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
H	2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$
Interpretación		Sensible: <8				Resistente: >256				Resistente: >256			

AMP		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$
Interpretación		Resistente: >256				Resistente: >256				Resistente: >256			

A este tiempo de lectura, la CMI real de cada una de las cepas no ha variado, a excepción de la cepa 10-75, que presenta un incremento de dos diluciones de orden superior, sin afectar a la interpretación de la sensibilidad del antibiótico (resistente). Por otro lado, hay que destacar que han virado todos los pocillos de las columnas representativas de orinas con recuentos de $>10^5$ ufc/ml, 10^5 ufc/ml y $10^5 - 10^4$ ufc/ml de las cepas 54-11, 10-75 y 15-28.

Comparación de los resultados de CMI obtenidos mediante el dispositivo y las técnicas de difusión disco-placa y microdilución.

Cepa	CMI dispositivo AMP	Difusión disco-placa	Coincide	CMI microdilución	Coincide
15 - 28	R	R	Sí	R	Sí
54 - 11	R	R	Sí	R	Sí
10 - 04	S	S	Sí	S	Sí
10 - 75	R	R	Sí	R	Sí
10 - 17	R	R	Sí	R	Sí
54 - 08	R	R	Sí	R	Sí

Tabla 16. Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con ampicilina.

5) Cotrimoxazol

El perfil de sensibilidad a cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) de los microorganismos testados en este ensayo se resume en la siguiente tabla:

Cepa (nº referencia)	CMI (mg/l)	Interpretación CMI	Disco-placa (mm)	Interpretación Disco-placa
15-28	<20	S	28	S
54-11	<20	S	27	S
10-04	<20	S	26	S
10-75	<20	S	27	S
10-17	<2	S	28	S
54-08	>320	R	0	R

Tabla 17. Perfil de sensibilidad a cotrimoxazol de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

Los puntos de corte establecidos por *CLSI* para determinar la sensibilidad del grupo de enterobacterias a cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol), se muestran en la siguiente tabla:

Guía CLSI	Sensible	Intermedio	Resistente
Cotrimoxazol	≤ 8 mg/l	-	≥ 16 mg/l

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

SXT		Cepa 10-17				Cepa 10-75				Cepa 10-04			
A	16	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B	8	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
C	4	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D	2	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
E	1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
F	0.5	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
G	0.25	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
H	0.12	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$
Interpretación		Sensible: 0.12				Sensible: 0.12				Sensible: 0.12			

SXT		Cepa 54-08				Cepa 54-11				Cepa 15-28			
A	16	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
B	8	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
C	4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D	2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E	1	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
F	0.5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
G	0.25	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
H	0.12	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$
Interpretación		Resistente: >16				Sensible: 0.25				Sensible: 0.5			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación se puede definir la CMI real de cada uno de los microorganismos sometidos a ensayo.

En 5/6 (83,3%) de las cepas, han virado los pocillos de la columna representativa de orinas con recuento de $>10^5$ ufc/ml. Solo en una cepa (10-75), han virado los pocillos de la columna representativa de una orina con recuento de 10^5 ufc/ml. A este tiempo de lectura, no hay crecimiento en ningún pocillo de la columna con un inóculo de $\frac{1}{2} \cdot 10^{-7}$ (10.000 – 100.000 ufc/ml).

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

SXT		Cepa 10-17				Cepa 10-75				Cepa 10-04			
A	16	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
B	8	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
C	4	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
D	2	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
E	1	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
F	0.5	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
G	0.25	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
H	0.12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$	$1/2 \cdot 10^{-3}$	$1/3 \cdot 10^{-5}$	$1/3 \cdot 10^{-6}$	$1/2 \cdot 10^{-7}$
Interpretación		Sensible: <0.12				Sensible: <0.12				Sensible: <0.12			

SXT		Cepa 54-08				Cepa 54-11				Cepa 15-28			
A	16	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
B	8	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
C	4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
D	2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E	1	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
F	0.5	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
G	0.25	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
H	0.12	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Resistente: >16				Sensible: 0.25				Sensible: 0.5			

A las 9 horas y 30 minutos de incubación la CMI real de cada una de las cepas no ha variado. Por otro lado, hay que destacar que han virado los pocillos de la columna representativa de una orina con recuento de entre 10⁵ – 10⁴ ufc/ml, únicamente en la cepa 10-75.

Comparación de los resultados de CMI obtenidos mediante el dispositivo y las técnicas de difusión disco-placa y microdilución.

Cepa	CMI dispositivo SXT	Difusión disco-placa	Coincide	CMI microdilución	Coincide
15 - 28	S	S	Sí	S	Sí
54 - 11	S	S	Sí	S	Sí
10 - 04	S	S	Sí	S	Sí
10 - 75	S	S	Sí	S	Sí
10 - 17	S	S	Sí	S	Sí
54 - 08	R	R	Sí	R	Sí

Tabla 18. Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con cotrimoxazol.

6) Vancomicina

Vancomicina es un antibiótico con un amplio espectro frente a microorganismos Gram positivos, no siendo activo frente a Gram negativos. Por ello, la guía *CLSI* no establece puntos de corte de vancomicina para *E.coli*.

Por tanto, es de esperar, que en las condiciones de impregnación definidas para este ensayo, haya una resistencia intrínseca por parte de los microorganismos Gram negativos (*E.coli*) testados.

Cepa (nº referencia)	Resultado de sensibilidad esperado a vancomicina
15-28	R
54-11	R
10-04	R
10-75	R
10-17	R
54-08	R

Tabla 19. Perfil de sensibilidad a vancomicina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

VAN		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17				
A	256	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
B	128	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
C	64	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
D	32	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
E	16	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
F	8	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
G	4	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
H	2	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	
Interpretación		Resistente				Resistente				Resistente				

VAN		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
B	128	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
C	64	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
D	32	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
E	16	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
F	8	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
G	4	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
H	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Resistente				Resistente				Resistente			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación se observa crecimiento bacteriano significativo en los pocillos de la columna con el inóculo estándar de trabajo en pruebas de microdilución (50.000 ufc/pocillo \approx $\frac{1}{2}$ 10⁻³).

En 6/6 (100%) de las cepas han virado los pocillos de la columna representativa de una orina con recuento de $>10^5$ ufc/ml. Sólo en una de las cepas (54-11), ha virado la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de 10⁵ ufc/ml.

En ninguna de las cepas, ha virado la columna representativa de una orina con recuento de $10^5 - 10^4$ ufc/ml.

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

VAN		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	256	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
B	128	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
C	64	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
D	32	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
E	16	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
F	8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
G	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
H	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$
Interpretación		Resistente				Resistente				Resistente			

VAN		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	256	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
B	128	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
C	64	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
D	32	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
E	16	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
F	8	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
G	4	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
H	2	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Inóculos		$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$	$1/2 \cdot 10^3$	$1/3 \cdot 10^5$	$1/3 \cdot 10^6$	$1/2 \cdot 10^7$
Interpretación		Resistente				Resistente				Resistente			

A las 9 horas y 30 minutos de incubación, han virado todos los pocillos de las columnas con inóculos representativos de orinas con un recuento de $>10^5$ ufc/ml y 10^5 ufc/ml.

Solo en 1/6 (16,6%) de las cepas (54-11), han virado los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de $10^5 - 10^4$ ufc/ml.

Para este ensayo, el 100% de las cepas mostraron resistencia intrínseca a vancomicina.

7) Colistina

Colistina es un antibiótico con un amplio espectro frente a microorganismos Gram negativos (no activo frente a Gram positivos), siendo poco frecuente la detección de resistencias por parte del grupo de enterobacterias a dicho compuesto. En este caso, la guía *CLSI* no establece puntos de corte de colistina para enterobacterias. En cambio, *EUCAST* sí establece puntos de corte ($R > 2$ mg/l).

Por ello, es de esperar, que en las condiciones de impregnación definidas para este ensayo, haya una elevada sensibilidad por parte de los microorganismos Gram negativos (*E.coli*) testados.

Cepa (nº referencia)	Resultado de sensibilidad esperado a colistina
15-28	S
54-11	S
10-04	S
10-75	S
10-17	S
54-08	S

Tabla 20. Perfil de sensibilidad a colistina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

En esta ocasión, se utilizaron los puntos de corte establecidos por EUCAST para determinar la sensibilidad de las cepas a colistina:

Guía EUCAST	Sensible	Intermedio	Resistente
Colistina	< 2 mg/l	-	> 2 mg/l

Esquema de distribución a las 7 horas 30 minutos:

COL		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	16	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
B	8	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
C	4	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D	2	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
E	1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
F	0.5	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
G	0.25	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
H	0.12	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: <0.12				Sensible: 0.25				Sensible: <0.12			

COL		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	16	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B	8	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C	4	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D	2	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
E	1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
F	0.5	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
G	0.25	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
H	0.12	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: 0.25				Sensible: 1				Sensible: <0.12			

A las 7 horas y 30 minutos de incubación se puede definir la CMI real de cada uno de los microorganismos sometidos a ensayo.

Destaca, que en 4/6 (66,6%) de las cepas han virado los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de >10⁵ ufc/ml. Además, en la cepa 54-11, han virado los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de 10⁵ ufc/ml.

Esquema de distribución a las 9 horas 30 minutos:

COL		Cepa 10-04				Cepa 54-11				Cepa 10-17			
A	16	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
B	8	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
C	4	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
D	2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
E	1	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
F	0.5	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
G	0.25	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H	0.12	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: 0.25				Sensible: 0.5				Sensible: 0.5			

COL		Cepa 10-75				Cepa 15-28				Cepa 54-08			
A	16	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
B	8	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
C	4	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
D	2	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
E	1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
F	0.5	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
G	0.25	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
H	0.12	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Inóculos		1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷	1/2 10 ⁻³	1/3 10 ⁻⁵	1/3 10 ⁻⁶	1/2 10 ⁻⁷
Interpretación		Sensible: 0.5				Sensible: 1				Sensible: 0.5			

A las 9 horas y 30 minutos ha variado la CMI real de cada uno de los microorganismos sometidos a ensayo, a excepción de la cepa 15-28.

En 6/6 (100%) de las cepas, han virado los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de $>10^5$ ufc/ml. Por otro lado, en 4/6 (66,6%) de las cepas, han virado también los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de 10^5 ufc/ml.

Únicamente en la cepa 54-11, han virado los pocillos de la columna con un inóculo representativo de una orina con recuento de 10^5-10^4 ufc/ml.

Para este ensayo, el 100% de las cepas se mostraron sensibles a colistina.

Teniendo en cuenta todos los ensayos realizados, el grado de correlación entre los resultados del dispositivo y el método de difusión disco-placa, ha sido del 95,2% (40/42). En cambio, el grado de correlación entre el dispositivo y el método de microdilución, ha sido del 90,5% (38/42).

4.3.2.- Resultados del ensayo para la determinación del tiempo de secado

Se observó que la mejor opción en el protocolo de impregnación es la desecación de 50 μ l del medio de cultivo triple concentrado a 37°C durante 6 horas, seguida de la adición de 10 μ l de antibiótico y una segunda desecación a 22°C durante 2 horas. Trabajando con medios de cultivo triple concentrados, se reduce el tiempo total del proceso de desecación a 8 horas.

La impregnación del antibiótico en un volumen de 10 μ l, con un tiempo de secado de 2 horas a 22°C, resulta viable, verificándose la no degradación del mismo.

4.4.- RESULTADOS DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE LECTURA DEL DISPOSITIVO POC-ITU

Los resultados obtenidos para todas las cepas y antibióticos se resumen en la siguiente tabla:

Tiempo de lectura	4 horas	7 - 8 horas	9 - 10 horas
Inóculo estándar en técnicas de microdilución (5 x 10 ⁴ ufc/pocillo)	5 (12%)	42 (100%)	42 (100%)
Concentraciones orinas >10 ⁵ ufc/ml	0 (0%)	34 (81%)	42 (100%)
Concentraciones orinas ≈ 10 ⁵ ufc/ml	0 (0%)	8 (19%)	35 (83%)
Concentraciones orinas entre 10 ⁵ y 10 ⁴ ufc/ml	0 (0%)	1 (2%)	15 (36%)

Tabla 21. Intervalos de tiempo de lectura del dispositivo POC-ITU a los cuales se positivizan orinas con distinto inóculo bacteriano.

De los resultados obtenidos se verifica que el tiempo de lectura más adecuado para la interpretación de los resultados del dispositivo, sería el intervalo comprendido entre 9 y 10 horas. A este tiempo de lectura, se observa que todas las orinas con recuentos de >10⁵ ufc/ml, han virado el medio, indicando cultivo positivo.

En los casos de orinas con recuentos entre 10⁵-10⁴ ufc/ml y orinas con recuentos de 10⁵ ufc/ml sin viraje en el pocillo de control, se deberán complementar estos resultados con el de otras pruebas diagnósticas (ej. Tinción de Gram, análisis del sedimento urinario etc.).

4.5.- RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE VALIDACIÓN “*IN VIVO*”

4.5.1.- Ensayo de validación multicéntrico

Para la validación técnica del dispositivo, se ensayaron un total de 400 orinas (241 positivas (>10⁵ ufc/ml), 149 negativas y 10 contaminadas) provenientes de pacientes con sospecha de ITU.

De las 400 orinas seleccionadas para el ensayo, se obtuvieron datos válidos de 395, tanto para el dispositivo POC-ITU como para el urinocultivo.

La mediana de edad de los pacientes fue de 61±22 años (rango = 4 – 92). El 80% eran mujeres, mientras que un 20% eran varones.

El microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *E.coli* (68,5%). Con menor frecuencia se aislaron *Klebsiella spp.* (14,1%), *E.faecalis* (6,2%), *P.mirabilis* (5%) y otros (6,2%).

Microorganismo	N	%
<i>E.coli</i>	165	68,5
<i>K.pneumoniae</i>	33	13,7
<i>K.oxytoca</i>	1	0,4
<i>E.faecalis</i>	15	6,2
<i>P.mirabilis</i>	12	5
<i>C.koseri</i>	6	2,5
<i>M.morganii</i>	4	1,7
<i>S.saprophyticus</i>	2	0,8
<i>E.cloacae</i>	1	0,4
<i>P.aeruginosa</i>	1	0,4
<i>P.stuartii</i>	1	0,4
TOTAL	241	100

Tabla 22. Distribución de microorganismos por género y especie aislados durante el ensayo multicéntrico.

■ Gram positivo ■ Gram negativo

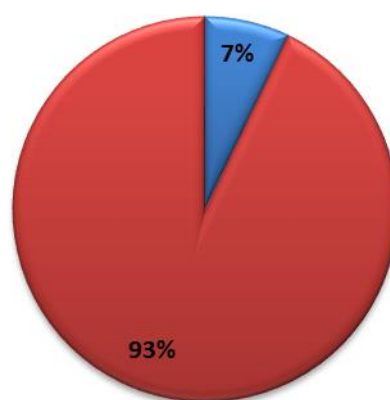


Figura 94. Porcentaje de microorganismos Gram positivos y Gram negativos aislados en el estudio multicéntrico.

El número y porcentaje de aislamientos por cada hospital, se muestra en la siguiente tabla:

Hospital	Microorganismo	N	%
HULP	<i>E.coli</i>	67	66
	<i>K.pneumoniae</i>	18	18
	<i>P.mirabilis</i>	4	4
	<i>E.faecalis</i>	8	8
	<i>C.koseri</i>	1	1
	<i>S.saprophyticus</i>	1	1
	<i>M.morganii</i>	2	2
HULR	<i>E.coli</i>	46	66
	<i>K.pneumoniae</i>	5	7
	<i>K.oxytoca</i>	1	1
	<i>P.mirabilis</i>	7	10
	<i>E.faecalis</i>	5	7
	<i>C.koseri</i>	4	6
	<i>E.cloacae</i>	1	1
	<i>P.aeruginosa</i>	1	1
PUHI	<i>E.coli</i>	52	74
	<i>K.pneumoniae</i>	10	14
	<i>P.mirabilis</i>	1	1
	<i>E.faecalis</i>	2	3
	<i>C.koseri</i>	1	1
	<i>S.saprophyticus</i>	1	1
	<i>M.morganii</i>	2	3
	<i>P.stuartii</i>	1	1

Tabla 23. Distribución de microorganismos aislados por centro hospitalario. HULP: Hospital Universitario La Paz; HULR: Hospital Universitario de La Ribera; PUHI: Hospital Universitario Puerta de Hierro.

Los porcentajes de resistencia de los dos principales microorganismos aislados en el ensayo multicéntrico (*Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*), se muestran en el siguiente gráfico:

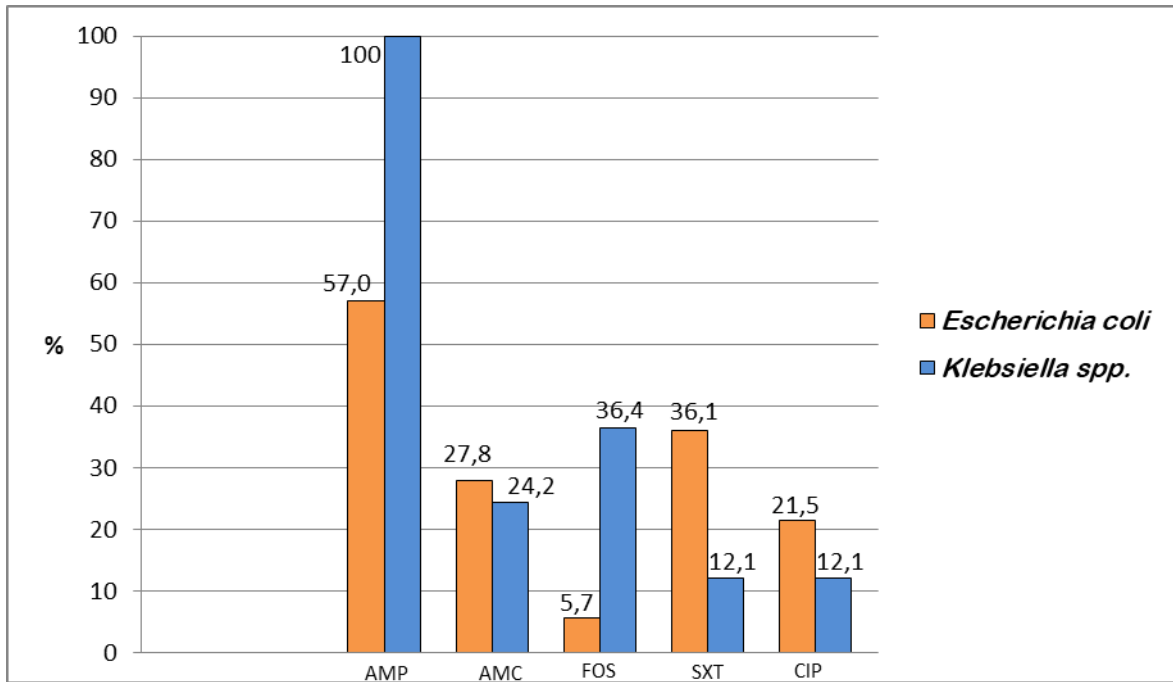


Figura 95. Porcentajes de resistencia de los aislados de *E.coli* y *Klebsiella spp.* AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ác. clavulánico; FOS: Fosfomicina; SXT: Cotrimoxazol; CIP: Ciprofloxacino.

El siguiente gráfico muestra los porcentajes de resistencia de la serie de microorganismos seleccionados para el estudio multicéntrico.

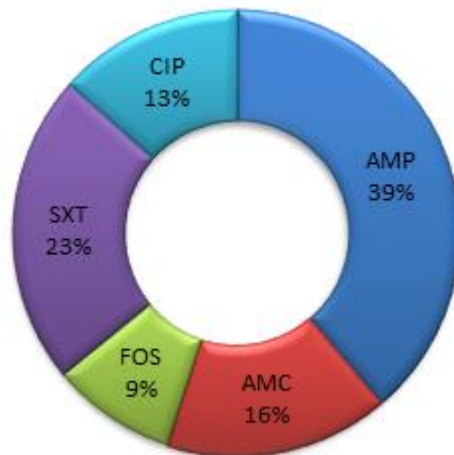


Figura 96. Porcentaje global de resistencia de la serie de microorganismos incluidos en el ensayo multicéntrico, a los antibióticos objetivo del estudio. AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ác. clavulánico; FOS: Fosfomicina; SXT: Cotrimoxazol; CIP: Ciprofloxacino.

En la siguiente tabla se muestra los porcentajes de sensibilidad y resistencia de la serie de microorganismos seleccionados para el estudio multicéntrico por cada hospital.

Ampicilina	HULP	HULR	PUHI
Sensible	34 (38%)	31 (46%)	26 (38%)
Resistente	56 (62%)	36 (54%)	43 (62%)
<hr/>			
Amoxicilina/ác. clavulánico			
Sensible	74 (82%)	53 (79%)	43 (62%)
Resistente	16 (18%)	14 (21%)	26 (38%)
<hr/>			
Fosfomicina			
Sensible	80 (89%)	55 (82%)	60 (87%)
Resistente	10 (11%)	12 (18%)	9 (13%)
<hr/>			
Cotrimoxazol			
Sensible	64 (71%)	44 (66%)	40 (58%)
Resistente	26 (29%)	23 (34%)	29 (42%)
<hr/>			
Ciprofloxacino			
Sensible	74 (82%)	54 (81%)	51 (74%)
Resistente	16 (18%)	13 (19%)	18 (26%)

Tabla 24. Porcentajes de sensibilidad y resistencia por centro hospitalario. HULP: Hospital Universitario La Paz; HULR: Hospital Universitario de La Ribera; PUHI: Hospital Universitario Puerta de Hierro.

Aproximadamente, 2/3 (241/395, 61%) de los pacientes tenía una infección urinaria microbiológicamente confirmada mediante urinocultivo. El 63% de las orinas presentaba piuria, mientras que un 52% mostraba bacteriuria significativa según el estudio de anormales y sedimento. Destacar, que el 100% de las orinas con piuria y bacteriuria, mostraron un resultado positivo tanto en el dispositivo POC-ITU como en el urinocultivo.

Se realizó una valoración estimada de la calidad de lectura de los resultados del dispositivo. Para ello, fue necesario la participación de al menos dos personas especializadas, las cuales cuantificaron los resultados como: 3+ (excelente), 2+ (moderada) y 1+ (deficiente). La media de la calidad de lectura fue de 2,9. Además, el tiempo medio de positividad/lectura del dispositivo fue de $7,8 \pm 1,5$ horas.

Por otro lado, se evaluaron cuatro variables cualitativas: bacteriuria significativa, contaminación de la orina, categorización Gram de la bacteria y fermentación de la lactosa. El método de referencia para comparar los resultados obtenidos en el dispositivo POC-ITU para estas cuatro variables fue el urinocultivo. En la tabla siguiente se muestran dichos resultados.

Variable (N)	Sensibilidad (%)	IC 95%	Especificidad (%)	IC 95%
<i>Bacteriuria significativa</i> (N = 395)	96,8	93,5 – 98,5	89,1	82,6 – 93,4
<i>Contaminación orina</i> (N = 240)	66,7	30,9 – 91,0	94,4	90,3 – 96,8
<i>Categorización Gram</i> (N = 218)	100	71,6 – 99,3	100	97,7 – 99,9
<i>Fermentación lactosa</i> (N = 216)	91,2	85,6 – 94,8	84,8	70,5 – 93,2

Tabla 25. Porcentajes de sensibilidad, especificidad y sus respectivos IC 95% de las variables cualitativas evaluadas.

Variable (N)	VPP (%)	IC 95%	VPN (%)	IC 95%
<i>Bacteriuria significativa</i> (N = 395)	93,7	89,9 – 96,3	94,2	88,6 – 97,3
<i>Contaminación orina</i> (N = 240)	31,6	13,6 – 56,5	98,6	95,8 – 99,6
<i>Categorización Gram</i> (N = 218)	100	71,6 – 99,3	100	97,7 – 99,9
<i>Fermentación lactosa</i> (N = 216)	95,7	90,9 – 98,1	72,2	58,1 – 83,1

Tabla 26. Porcentajes de VPP, VPN y sus respectivos IC 95% de las variables cualitativas evaluadas.

Tabla 27. Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC y la prueba de referencia (urinocultivo).

Un P -valor $\leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.

	Bacteriuria significativa (urinocultivo)		P -valor	
	Sí	No		
Bacteriuria significativa (dispositivo POC)	Sí	240 (96,8%)	16 (10,9%)	0,152
	No	8 (3,2%)	131 (89,1%)	

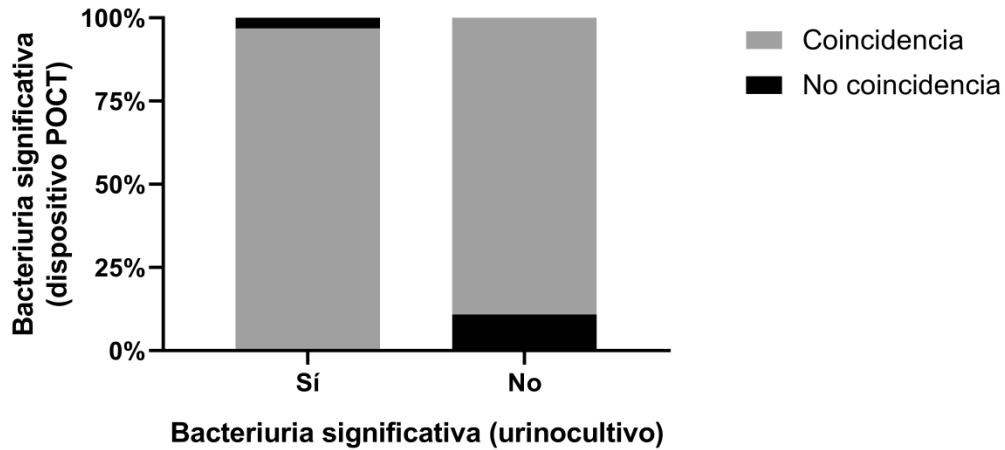


Figura 97. Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable bacteriuria significativa.

*** P -valor \leq a 0,001

* P -valor \leq a 0,050

Según se observa en los resultados de la tabla 27, es indiferente utilizar una técnica u otra para la detección de bacteriuria significativa, puesto que el P -valor es $>0,050$, por tanto, se obtendrá el mismo resultado (en la mayoría de los casos) tanto con el urinocultivo como con el dispositivo POC-ITU.

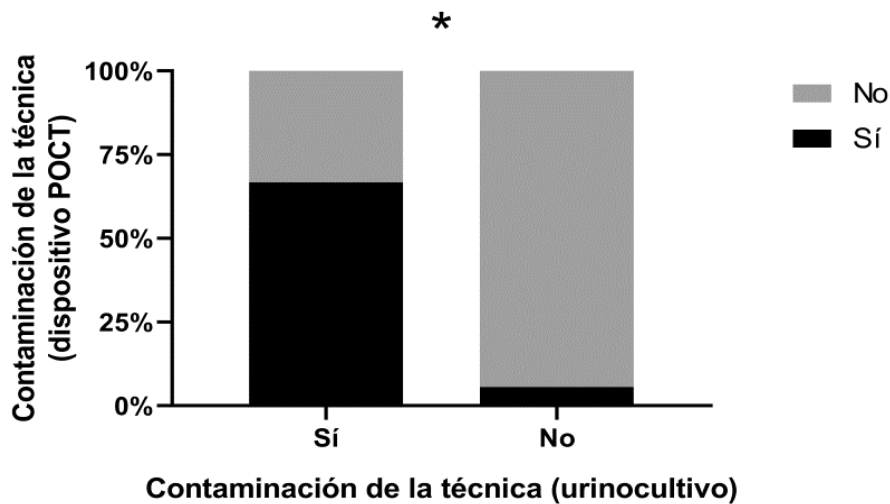


Figura 98. Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable contaminación de la orina.

*** P -valor \leq a 0,001

* P -valor \leq a 0,050

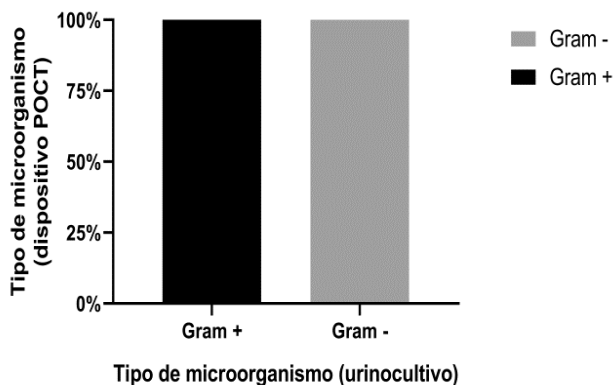


Figura 99. Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable categoría Gram de la bacteria.

*** P -valor \leq a 0,001
 * P -valor \leq a 0,050

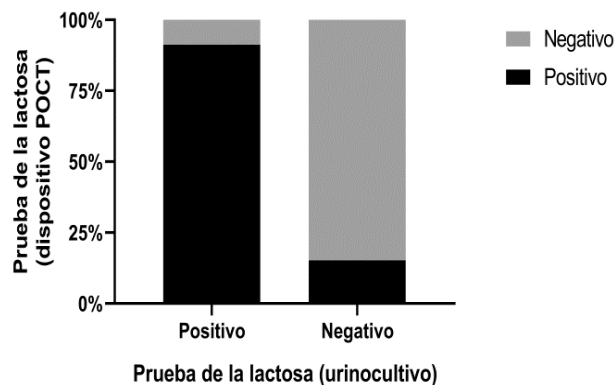


Figura 100. Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable fermentación de la lactosa.

*** P -valor \leq a 0,001
 * P -valor \leq a 0,050

Para el resto de variables cualitativas evaluadas, no se detectaron diferencias significativas, a excepción, de la variable cualitativa “contaminación de la orina”, que sí presentó diferencias significativas entre el urinocultivo y el dispositivo POC-ITU (P -valor 0,021).

En relación a los porcentajes de falsos positivos y falsos negativos de las distintas variables cualitativas evaluadas, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Variable (N)	Falsos positivos	%	Falsos negativos	%
<i>Bacteriuria significativa</i> (N = 395)	18	4,5	8	2
<i>Orina contaminada</i> (N = 240)	15	6,2	3	1,2
<i>Categorización Gram</i> (N = 218)	0	0	0	0
<i>Fermentación lactosa</i> (N = 216)	7	3,2	16	7,4

Tabla 28. Porcentaje de falsos positivos y falsos negativos de las distintas variables cualitativas evaluadas del dispositivo POC-ITU.

Adicionalmente, la tabla 29 muestra los resultados del antibiograma del dispositivo POC-ITU frente al antibiograma convencional.

Antibiótico	N	Sensibilidad (%)	IC 95%	Especificidad (%)	IC 95%
<i>Ampicilina</i>	218	99,2	95,1 - 99,9	79,8	69,7 - 87,3
<i>Amoxicilina/Ác.clavulánico</i>	218	100	91,7 - 99,8	54,9	46,9 - 62,6
<i>Fosfomicina</i>	218	82,8	63,5 - 93,5	94,2	89,5 - 96,9
<i>Cotrimoxazol</i>	218	98,7	91,9 - 99,9	84,5	77,3 - 89,8
<i>Ciprofloxacino</i>	218	95,4	83,3 - 99,2	97,1	93,1 - 98,9

Tabla 29. Porcentajes de sensibilidad, especificidad y sus respectivos IC 95% de los antibióticos ensayados.

Antibiótico	N	VPP (%)	IC 95%	VPN (%)	IC 95%
<i>Ampicilina</i>	218	87,7	80,9 – 92,3	98,6	91,5 – 99,9
<i>Amoxicilina/Ác.clavulánico</i>	218	42,2	33,6 – 51,2	100	94,9 – 99,9
<i>Fosfomicina</i>	218	68,6	50,6 – 82,6	97,3	93,4 – 98,9
<i>Cotrimoxazol</i>	218	77,3	67,5 – 84,9	99,2	94,8 – 99,9
<i>Ciprofloxacino</i>	218	89,4	76,1 – 96,0	98,8	95,4 – 99,8

Tabla 30. Porcentajes de VPP, VPN y sus respectivos IC 95% de los antibióticos ensayados.

En este contexto, un resultado falso positivo (FP) se define como la resistencia de una bacteria para un determinado antibiótico cuando en realidad, ésta es sensible. En cambio un resultado falso negativo (FN) se define como la susceptibilidad que presenta una bacteria a un determinado antibiótico cuando ésta es resistente. Los resultados de FP y FN respectivamente, para los antibióticos testados fueron: ampicilina (8,2% vs 0,5%), amoxicilina/ácido clavulánico (33,8% vs 0%), fosfomicina (5% vs 2,3%), cotrimoxazol (10% vs 0,5%) y ciprofloxacino (2,3% vs 0,9%).

Tabla 31. Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC y la prueba de referencia (urinocultivo) en relación al antibiograma.

Un P -valor $\leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.

		Prueba de la ampicilina (urinocultivo)		P -valor
		Sensible	Resistente	
Prueba de la ampicilina (dispositivo POC)	Sensible	71 (79,8%)	1 (0,8%)	< 0,001
	Resistente	18 (20,2%)	128 (99,2%)	
		Prueba de la amoxicilina/ácido clavulánico (urinocultivo)		P -valor
		Sensible	Resistente	
Prueba de la amoxicilina/ácido clavulánico (dispositivo POC)	Sensible	90 (54,9%)	0 (0%)	< 0,001
	Resistente	74 (45,1%)	54 (100%)	
		Prueba de la fosfomicina (urinocultivo)		P -valor
		Sensible	Resistente	
Prueba de la fosfomicina (dispositivo POC)	Sensible	178 (94,2%)	5 (17,2%)	0,210
	Resistente	11 (5,8%)	24 (82,8%)	
		Prueba del cotrimoxazol (urinocultivo)		P -valor
		Sensible	Resistente	
Prueba del cotrimoxazol (dispositivo POC)	Sensible	120 (84,5%)	1 (1,3%)	< 0,001
	Resistente	22 (15,5%)	75 (98,7%)	
		Prueba del ciprofloxacino (urinocultivo)		P -valor
		Sensible	Resistente	
Prueba del ciprofloxacino (dispositivo POC)	Sensible	169 (97,1%)	2 (4,5%)	0,453
	Resistente	5 (2,9%)	42 (95,5%)	

ITU, infección del tracto urinario.

POC, *Point of Care*.

Se muestran solo los valores de aquellos casos emparejados para cada una de las variables equivalentes de la técnica de referencia (urinocultivo) y la técnica de estudio (dispositivo POC).

En la tabla 31, se puede observar que las principales diferencias significativas entre el antibiograma del dispositivo POC-ITU y el antibiograma convencional, se observan en los antibióticos ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y cotrimoxazol.

Por cada cien ensayos en los que el microorganismo se muestra sensible *in vitro* por el método de referencia a la ampicilina, en 20 ocasiones, el dispositivo POC-ITU consideraría resistente al microorganismo. En el caso de amoxicilina/ác. clavulánico y

cotrimoxazol, en un 45% y un 15%, respectivamente, serían sensibles *in vitro* por el método de referencia y resistentes en el dispositivo POC-ITU. Es decir, el mayor número de discrepancias entre ambas técnicas para estos antibióticos, ocurre cuando el dispositivo informa el antibiótico como resistente, cuando realmente es sensible.

Para los antibióticos fosfomicina y ciprofloxacino, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el antibiograma del dispositivo POC-ITU y el método de referencia, por tanto, en la mayoría de casos, se obtendrá el mismo resultado por ambas técnicas.

A pesar de considerar la microdilución en caldo, como método de referencia para cotejar los resultados del antibiograma del dispositivo POC-ITU, cabe destacar como posible limitación del estudio no haber realizado una tercera técnica de referencia (ej. E-test) para confirmar los resultados discrepantes entre el dispositivo y el *gold standard*, o bien, hacer un seguimiento post-tratamiento del paciente para valorar si el antibiótico pautado fue efectivo *in vivo* en estos casos.

Los porcentajes de correlación entre las dos técnicas para las distintas variables cualitativas evaluadas fueron: bacteriuria significativa (87%), orina contaminada (40%), categorización Gram de la bacteria (100%) y fermentación de la lactosa (71%). En cambio, los porcentajes de correlación para los antibióticos testados fueron: ampicilina (81%), amoxicilina/ácido clavulánico (38%), fosfomicina (71%), cotrimoxazol (78%) y ciprofloxacino (90%).

Variable	Índice kappa	IC 95%	% correlación	Fuerza de la concordancia
<i>Orina contaminada</i>	0,4	0,1 – 0,7	40%	Débil
<i>Interpretación G+/G-</i>	1	1,0 – 1,0	100%	Muy buena
<i>Bacteriuria significativa</i>	0,9	0,8 – 0,9	87%	Muy buena
<i>Fermentación lactosa</i>	0,7	0,6 – 0,8	71%	Buena
<i>Ampicilina</i>	0,8	0,7 – 0,9	81%	Muy buena
<i>Amoxicilina/Clavulánico</i>	0,4	0,3 – 0,5	38%	Débil
<i>Fosfomicina</i>	0,7	0,6 – 0,8	71%	Buena
<i>Cotrimoxazol</i>	0,8	0,7 – 0,9	78%	Buena
<i>Ciprofloxacino</i>	0,9	0,8 – 0,8	90%	Muy buena

Tabla 32. Porcentajes de correlación y sus respectivos IC 95% de las distintas variables del dispositivo POC-ITU evaluadas.

Tabla 33. Estudio del manejo de las dos técnicas en los diferentes hospitales participantes en el estudio multicéntrico.

Un P -valor $\leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.

Parámetro	Hospital			P-valor
	HULP	HULR	PUHI	
Bacteriuria significativa (dispositivo POC)				
Sí	120 (60,6%)	67 (69,1%)	69 (69,0%)	0,215
No	78 (39,4%)	30 (30,9%)	31 (31,0%)	
Bacteriuria significativa (urinocultivo)				
Sí	108 (54,5%)	67 (69,1%)	73 (73,0%)	0,003
No	90 (45,5%)	30 (30,9%)	27 (27,0%)	
Contaminación de la orina (dispositivo POC)				
Sí	17 (14,2%)	2 (3,0%)	5 (7,2%)	0,670
No	103 (85,8%)	65 (97,0%)	64 (92,8%)	
Contaminación de la orina (urinocultivo)				
Sí	7 (6,5%)	0 (0%)	3 (4,1%)	0,106
No	101 (93,5%)	67 (100%)	70 (95,9%)	
Prueba de la lactosa (dispositivo POC)				
Positivo	81 (67,5%)	42 (65,6%)	54 (78,3%)	0,204
Negativo	39 (32,5%)	22 (34,4%)	15 (21,7%)	
Prueba de la lactosa (urinocultivo)				
Positivo	76 (82,6%)	42 (65,6%)	57 (85,1%)	0,012
Negativo	16 (17,4%)	22 (34,4%)	10 (14,9%)	
Tipo de microorganismo (dispositivo POC)				
Gram positivo	12 (11,7%)	3 (4,6%)	3 (4,7%)	0,141
Gram negativo	91 (88,3%)	62 (95,4%)	61 (95,3%)	
Tipo de microorganismo (urinocultivo)				
Gram positivo	9 (8,9%)	3 (4,5%)	3 (4,3%)	0,364
Gram negativo	92 (91,1%)	64 (95,5%)	67 (95,7%)	

ITU, infección del tracto urinario.

POC, *Point of Care*.

HULP, Hospital Universitario La Paz.

HULR, Hospital Universitario de La Ribera.

PUHI, Hospital Universitario Puerta de Hierro.

En base al estudio comparativo del manejo de las dos técnicas entre los distintos hospitales participantes en el estudio multicéntrico, hay que destacar la diferencia en el tamaño muestral (N) para algunas variables estudiadas, siendo esto una limitación del

estudio. No obstante, esto puede deberse a la diferencia en el número de ensayos realizados por cada hospital, así como, a la diversidad de los microorganismos seleccionados para los mismos.

En vista de los resultados obtenidos, destaca que la interpretación de la variable “bacteriuria significativa” en el dispositivo POC-ITU no presenta diferencias significativas entre los distintos centros (P -valor 0,215), mientras que en el urinocultivo sí las hay (P -valor 0,003). Esto evidencia, que la interpretación del dispositivo es menos subjetiva que el urinocultivo, pues éste último está sujeto a la interpretación y al criterio por el que pueda optar el Microbiólogo, no siendo homogéneo en muchas ocasiones.

En relación a la variable “contaminación de la orina”, no se detectaron diferencias significativas (P -valor $>0,050$) entre los distintos centros a la hora de interpretar tanto el urinocultivo, como el dispositivo POC-ITU. A pesar de la menor capacidad del dispositivo para detectar contaminación de la muestra de orina en relación al urinocultivo (ver resultados anteriores), la interpretación de este parámetro mediante el dispositivo es equiparable al de la técnica de referencia.

Respecto a la interpretación del resultado de la variable “fermentación de lactosa” en el dispositivo POC-ITU, no se aprecian diferencias significativas (P -valor 0,204) entre los distintos centros. No obstante, sí hay diferencias en el urinocultivo (P -valor 0,012). Esta diferencia puede deberse al uso como urinocultivo, del medio cromogénico, no siendo un medio específico para la detección de la fermentación de este azúcar.

Finalmente, no se observan diferencias significativas (P -valor $>0,050$) para la categorización Gram de la bacteria por ninguna de las dos técnicas entre los distintos hospitales.

Tabla 34. Estudio del manejo del antibiograma del dispositivo POC-ITU en los diferentes hospitales participantes en el estudio multicéntrico.

Un P -valor $\leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.

Parámetro	Hospital			P -valor
	HULP	HULR	PUHI	
Prueba de la ampicilina (dispositivo POC)				
Sensible	22 (24,4%)	24 (36,9%)	27 (42,2%)	0,054
Resistente	68 (75,6%)	41 (63,1%)	37 (57,8%)	
Prueba de la amoxicilina/ác. clavulánico (dispositivo POC)				
Sensible	37 (41,1%)	28 (43,1%)	26 (40,6%)	0,955
Resistente	53 (58,9%)	37 (56,9%)	38 (59,4%)	
Prueba de la fosfomicina (dispositivo POC)				
Sensible	76 (84,4%)	56 (86,2%)	52 (81,3%)	0,741
Resistente	14 (15,6%)	9 (13,8%)	12 (18,8%)	
Prueba del cotrimoxazol (dispositivo POC)				
Sensible	56 (62,2%)	33 (50,8%)	32 (50,0%)	0,222
Resistente	34 (37,8%)	32 (49,2%)	32 (50,0%)	
Prueba del ciprofloxacino (dispositivo POC)				
Sensible	73 (81,1%)	50 (76,9%)	49 (76,6%)	0,740
Resistente	17 (18,9%)	15 (23,1%)	15 (23,4%)	

ITU, infección del tracto urinario.

POC, *Point of Care*.

HULP, Hospital Universitario La Paz.

HULR, Hospital Universitario de La Ribera.

PUHI, Hospital Universitario Puerta de Hierro.

Respecto al estudio inter-hospitalario que compara el manejo e interpretación del antibiograma del dispositivo POC-ITU, a pesar del diferente tamaño muestral (N) para algunos de los antibióticos ensayados (limitación del estudio), se observa que no hay diferencias significativas (P -valor $>0,050$) para los antibióticos ensayados. En el caso de los resultados para ampicilina, las frecuencias muestran una pequeña tendencia a un manejo e interpretación ligeramente diferente. No obstante, estos resultados demuestran la alta reproducibilidad en el manejo e interpretación del antibiograma del dispositivo POC-ITU entre los distintos centros.

4.5.2.- Ensayo de validación a “pie de campo” (Zanzíbar)

Durante el período (21 días) de estancia en Zanzíbar para la validación a “pie de campo” del dispositivo POC-ITU, se realizaron 85 ensayos con muestras procedentes de pacientes con sospecha de cistitis aguda.

La edad media de los pacientes fue de 23 años (rango: 0-32). El 91% de las muestras de orina, procedían de mujeres.

El dispositivo determinó bacteriuria significativa en el 17,6% (15/85) de los casos. En cambio, en un 82,3% (70/85) el dispositivo determinó ausencia de infección. En comparación con el método de referencia (cultivo bacteriano), éste determinó ITU en un 15,3% (13/85) de los pacientes.

Por tanto, el dispositivo POC-ITU mostró un porcentaje de correlación con el método de referencia de >98%.

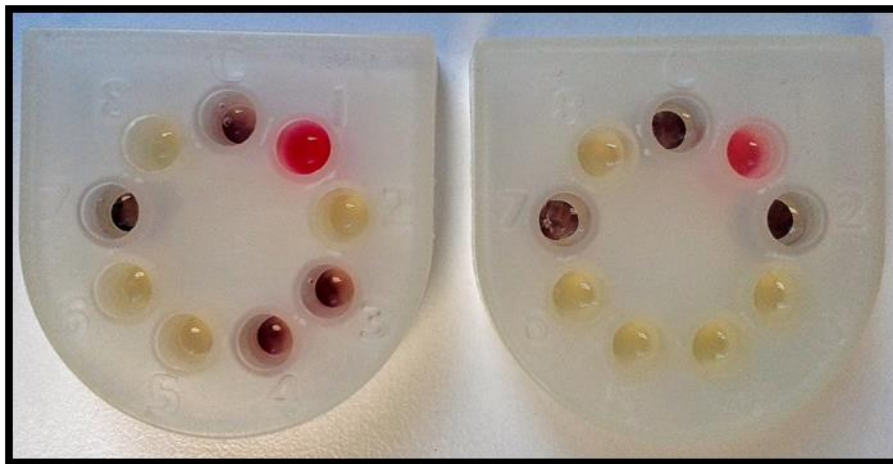


Figura 101. Resultados del dispositivo POC-ITU en los ensayos realizados a “pie de campo” con muestras clínicas de orina provenientes de pacientes con sospecha de ITU.

MUESTRA 1 = Microorganismo gram-negativo (por ser sensible a colistina [pocillo 2] y resistente a vancomicina [pocillo 3]), fermentador de lactosa (pocillo nº 1 positivo). Resistente a ampicilina (pocillo 4) y cotrimoxazol (pocillo 7). Sensible a amoxicilina-clavulánico (pocillo 5), fosfomicina (pocillo 6) y ciprofloxacino (pocillo 8).

MUESTRA 2 = Microorganismo gram-positivo (por ser resistente a colistina [pocillo 2] y sensible a vancomicina [pocillo 3]). Sensible a todos los antibióticos excepto a cotrimoxazol (pocillo 7).

5.- DISCUSIÓN:

En este apartado se incluyen diversas reflexiones sobre la consecución de los objetivos de la Tesis Doctoral, la metodología de trabajo empleada y los resultados más relevantes. Se realizan también diversos análisis relacionados con los materiales y tecnologías utilizadas, con las soluciones llevadas a cabo y con la metodología propuesta para el desarrollo de nuevos dispositivos médicos basados en el empleo de reactivos colorimétricos para la detección de crecimiento bacteriano y resistencia a los agentes antiinfecciosos.

Estas reflexiones ayudan a exponer de forma objetiva algunas limitaciones científico-tecnológicas actuales, que motivan futuras líneas de continuación, en los distintos aspectos y campos estudiados.

5.1.- CONSECUSIÓN DE LOS OBJETIVOS PLANEADOS

Se analiza en este apartado la consecución de los distintos objetivos (tanto principales como secundarios) planteados al comienzo de la Tesis Doctoral, junto a las principales limitaciones que motivan el continuar investigando en estos temas.

Se ha desarrollado una aplicación médica concreta, relacionada con el empleo de sustancias cromóforas capaces de detectar bacteriuria significativa en pacientes con sospecha de cistitis en un intervalo de tiempo no superior a las 10 horas desde la toma de muestra. El dispositivo obtenido aporta ventajas notables frente a las técnicas convencionales, según se ha detallado y según se discute en este apartado de forma adicional. Dicho dispositivo se ha validado mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, alcanzando la fase previa a su puesta en el mercado. Dicha fase queda fuera del alcance de la Tesis Doctoral.

En relación con los objetivos secundarios es necesario detallar los siguientes aspectos. Se ha establecido una metodología estructurada para potenciar el desarrollo de dispositivos médicos *Point of Care* basados en el empleo de sustancias cromóforas capaces de detectar mediante una reacción colorimétrica, la presencia de bacterias y el perfil de resistencia a determinados agentes antiinfecciosos.

Dicha metodología surge, en parte, como fruto de los estudios realizados sobre metodologías de desarrollo de productos, sobre las dificultades especiales que implica el desarrollo de dispositivos médicos, sobre la situación epidemiológica actual en relación al aumento de las resistencias antibióticas a nivel mundial y la dificultad que presentan los países en vías de desarrollo, para acceder a un laboratorio de Microbiología.

Por otro lado, los desarrollos llevados a cabo han ayudado a perfeccionar dicha metodología en base a los principales éxitos obtenidos y a las dificultades encontradas durante el proceso. Futuros desarrollos aplicando la metodología propuesta ayudarán a mejorarla y a ampliar su campo de aplicación.

Una parte importante de las investigaciones realizadas han estado ligadas a la obtención de modelos de comportamiento y simuladores asociados, que potencien y faciliten futuras tareas de integración unidas al empleo de estos reactivos colorimétricos en dispositivos médicos destinados a detectar infección en otras muestras clínicas.

Como consecuencia de las distintas investigaciones se han detectado necesidades en diversos aspectos relacionados con el desarrollo de dispositivos médicos *Point of Care* y con los reactivos que aportan dichas capacidades. Si bien, se incluyen en este apartado distintas líneas generales de continuación de las investigaciones, incluyendo propuestas futuras concretas, como resultado adicional de la Tesis Doctoral.

5.2.- ANÁLISIS DE LAS TECNOLOGÍAS EMPLEADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL

Es importante destacar, la gran ayuda que aportan las herramientas de simulación y otros programas de diseño, cálculos y fabricación asistidos por ordenador. Dicha ayuda es especialmente adecuada para la realización de comparativas de diseño de forma más rápida, así como para ayudar en tareas de selección de materiales, diseño y validación de su empleo.

En cuanto a las tecnologías de prototipado rápido, en la Tesis Doctoral se ha mostrado las enormes ventajas que aportan para fabricar prototipos con los que realizar pruebas que acompañen al proceso de desarrollo de un dispositivo y faciliten la detección y corrección de errores, ayudando también a la toma de decisiones.

Esta tecnología es especialmente útil en el apoyo al desarrollo de dispositivos basados en el fenómeno de la microfluídica. El empleo de la estereolitografía láser permite la obtención de forma directa a partir de archivos “CAD”, prototipos con los que realizar pruebas conceptuales. Se trata de un recurso importante en la fabricación de sistemas que trabajan con microfluidos, ya que permite la fabricación de dispositivos “*lab on a chip*” con canales internos para pruebas funcionales “*in vitro*”.

5.3.- ANÁLISIS DE LAS SOLUCIONES DIAGNÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS PROPUESTAS

Como parte de los resultados de la Tesis Doctoral es importante destacar que se ha diseñado, patentado, desarrollado, fabricado, perfeccionado y validado, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, un dispositivo para el diagnóstico de infección urinaria y antibiograma rápido en el punto de atención del paciente. Está basado en el empleo de una sustancia cromófora (violeta de tetrazolio), capaz de revelar la presencia de bacteriuria significativa en un corto espacio de tiempo, lo cual reporta ventajas notables respecto a las técnicas microbiológicas comúnmente usadas para el diagnóstico de ITU.

Mediante la realización de un estudio multicéntrico a gran escala y con pacientes reales se puede ayudar a destacar las ventajas del dispositivo desarrollado y obtener información relevante sobre la infección urinaria. Dicho estudio puede aportar datos demográficos sobre:

- Prevalencia de la ITU en la población general.
- Distribución por edades de dicha prevalencia.
- Distribución por sexo de dicha prevalencia.
- Grado de correlación entre el estudio de anormales-sedimentos y el urinocultivo.
- Conocimiento de las resistencias antimicrobianas de los principales microorganismos uropatógenos.

De esta manera, el dispositivo POC para diagnóstico de ITU y antibiograma rápido (POC-ITU), basado en los resultados de los prototipos desarrollados en la Tesis Doctoral, no solo permitirá realizar estudios clínicos, sino también, en la versión final

comercializable, podrá asistir al personal sanitario, tanto del entorno hospitalario como ambulatorio, para realizar un correcto diagnóstico de ITU. Dicho dispositivo ayudará también en la toma de decisiones relativas al tratamiento antibiótico a prescribir, e indirectamente, a frenar el progresivo incremento de las resistencias bacterianas a los antimicrobianos.

Y es que, los médicos de Atención Primaria, prescriben la mayoría de antibióticos utilizados en la atención médica (Costelloe et al., 2010), siendo el 15% para el tratamiento de la ITU no complicada (Mazulli T., 2002). Por lo tanto, mejorar la calidad de las decisiones de prescripción de antibióticos en este entorno, puede hacer una contribución importante para reducir las resistencias a los agentes antimicrobianos.

Para ello, es necesario hacer hincapié en distintos conceptos o estrategias, incluyendo aspectos culturales, prácticos o asistenciales. En primer lugar, es necesario concienciar al clínico sobre la dificultad que supone hacer un correcto diagnóstico de ITU. Incluso en situaciones en las que el médico considera que el caso es sencillo, pueden realizarse diagnósticos incorrectos y por ello, hay que enfatizar en la necesidad de hacer uso de los dispositivos *Point of Care* para orientar las decisiones terapéuticas, sobre todo, en las “áreas sombrías” de interpretación de resultados.

Por otro lado, la educación clínica juega un papel relevante. Independientemente de que una prueba de laboratorio (ej. dispositivo POC) consiga esclarecer el juicio diagnóstico del médico, la decisión posterior acerca de la interrupción o no, del tratamiento antibiótico, es tan importante como realizar un correcto diagnóstico clínico. En el contexto más amplio de la comunicación entre el médico y el paciente, un médico que solicita al paciente que interrumpa el tratamiento antibiótico prescrito, puede interpretarse como un acto de inseguridad por parte del clínico, generando desconfianza en el paciente (Brown et al., 1987). De hecho, algunos estudios resaltan la sensación de seguridad que transmite una prueba POC en el paciente (Lucy Brookes-Howell et al., 2019). Por ello, habría que instar a los médicos a que valorasen retrasar sus decisiones, en espera de los resultados de la prueba POC, y que aclaren el mensaje de salud que quieren transmitir, ya sea detener un posible tratamiento antibiótico innecesario, o continuar con dicho tratamiento.

No obstante, es importante conocer el contexto social al que se enfrenta el clínico. Es decir, si se encuentra ante un paciente sintomático, un paciente con preferencia por el uso no justificado de antibióticos, o el deseo de aliviar la incomodidad del paciente. Se necesitan estrategias para alentar a los pacientes con síntomas de ITU, que retrasen el

inicio de los antibióticos hasta que se conozca el resultado de la prueba de laboratorio. Una forma de hacerlo sería proporcionar a los médicos herramientas diagnósticas rápidas, con las que frenar el deseo compulsivo de la toma de antibióticos por parte del paciente, y dar a los médicos una estrategia de autogestión socialmente aceptable que les permita prescindir o retrasar, la prescripción de antibióticos de forma indiscriminada.

Para evaluar la precisión diagnóstica, del dispositivo POC-ITU de Diagnochip[®], se llevaron a cabo las evaluaciones en distintos entornos clínicos para resaltar los beneficios y limitaciones del mismo en comparación con la técnica *gold estándar* para el diagnóstico de ITU, el urinocultivo (Schmiemann et al., 2010; Arienzo et al., 2019). A pesar de que la confiabilidad diagnóstica absoluta y la terapia máximamente específica, solo se lograría utilizando el urinocultivo, los resultados informados en este estudio revelan una alta correlación (87%), sensibilidad (97%) y especificidad (89%) por parte del dispositivo POC-ITU, para la detección de bacteriuria significativa.

Mientras que el urinocultivo requiere un esfuerzo adicional de personal, recursos y sobre todo, tiempo, obteniendo resultados fehacientes de infección urinaria y antibiograma en 48-72 horas, el dispositivo ofrece resultados en un espacio de tiempo no superior a las 10 horas (tiempo medio lectura del dispositivo 7,8 horas) desde la toma de muestra del paciente, evitando de esta manera, retrasar la terapia dirigida.

Esta prestación es muy importante para el clínico, tal y como recoge el estudio de Lucy Brookes-Howell et al., 2019, dónde los médicos priorizan la rapidez en la obtención de resultados por encima incluso, de la precisión y fiabilidad de la técnica diagnóstica. De hecho, un reciente informe emitido por el Gobierno de Reino Unido a raíz de la creciente resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos, determinó que entre los principales deseos o anhelos del personal sanitario, figuraba la detección rápida de resistencias (O'Neill J., 2015).

Esta reducción de los tiempos de respuesta, no solo beneficiaría a pacientes con cistitis aguda, sino que tendría un gran impacto en el manejo de pacientes con un proceso séptico asociado. Y es que, teniendo en cuenta que la ITU es la principal causa de bacteriemia en el 30% de los pacientes que sufren un cuadro de sepsis o shock séptico (Wagenlehner et al., 2015), este grupo poblacional se beneficiaría de una herramienta que ayudaría a prevenir una posible bacteriemia asociada a dicha infección, en la “*hora dorada de la sepsis*”.

Por otro lado, la interpretación del urinocultivo requiere de personal cualificado, generalmente un Microbiólogo, no siendo siempre posible en el entorno comunitario o zonas rurales. En muchas ocasiones, la presencia de bacteriuria puede derivar en un tratamiento antibiótico innecesario (Finucane TE., 2017), de ahí la necesidad de un especialista que interprete y aplique los criterios diagnósticos y puntos de corte establecidos, para el diagnóstico de ITU a partir del urinocultivo. En el dispositivo POC-ITU de Diagnochip[®], esta función la realiza el pocillo control, validado para la detección de bacteriuria significativa ($>10^5$ ufc/ml) (Blom et al., 2002). Consideramos que esta prestación aportaría una destacada ventaja respecto a otros dispositivos POC comercializados (Lucy Brookes-Howell et al., 2019), donde la interpretación del recuento bacteriano es confusa y no concluyente, derivando en un tratamiento antibiótico innecesario en algunos casos (Butler et al., 2018). No obstante, una de las limitaciones del dispositivo POC-ITU, es la no detección de bacteriurias con un inóculo bacteriano $<10^5$ ufc/ml en el tiempo de lectura definido por el dispositivo (8 horas). En estos casos, se podría subestimar la infección, ya que recuentos bajos de bacterias en orina pueden tener importancia clínica en categorías particulares de pacientes (Stark et al., 1984), pero estas infecciones generalmente no se tratan, aunque pueden degenerar en infecciones urinarias de alto inóculo en pocos días. Por tanto, ante una alta sospecha de ITU, habría que solicitar técnicas diagnósticas complementarias como el estudio de anormales y sedimento, la microscopía óptica o la tinción de Gram.

El dispositivo POC-ITU mostró un 2% (8/395) de falsos negativos para la detección de bacteriuria significativa. No obstante, estos resultados están sujetos a la correcta, y en muchas ocasiones, subjetiva, interpretación del urinocultivo. Y es que, no existe un punto de corte universal que permita establecer de forma inequívoca a partir de que recuento el urinocultivo es positivo, y por tanto, si existe infección urinaria o se trata de una contaminación de la muestra. Algunos estudios han demostrado que las muestras de orina de mujeres sintomáticas con piuria a menudo presentan $<10^5$ ufc/ml (Kunin et al., 1993) y, por lo tanto, se han debatido los criterios diagnósticos para pacientes sintomáticos. Otros autores, consideran que un recuento de 10^3 ufc/ml de un microorganismo uropatógeno primario, puede ser indicativo de infección urinaria (Kouri et al., 2000). Incluso, para establecer un correcto diagnóstico de ITU, otros autores consideran necesario conocer la clínica y los síntomas del paciente (Arienzo et al., 2019), así como, establecer puntos de corte en base a la edad y el sexo de los mismos (Grabe et al., 2015). Sin embargo, como recoge nuestro ensayo de campo, debe

destacarse que la mayoría de los pacientes sintomáticos tienen inóculos bacterianos en orina de $>10^5$ ufc/ml.

En comparación con los métodos tradicionales de diagnóstico de ITU, como la tira reactiva de orina y la microscopía óptica, el dispositivo POC-ITU muestra mejores resultados en cuanto a sensibilidad y prestaciones. No obstante, dichas técnicas no son excluyentes, y sí complementarias, tal y como reflejan los resultados obtenidos en el ensayo multicéntrico. A pesar de que el uso simultáneo de estas dos técnicas (tira reactiva y microscopía) ha mejorado la prescripción adecuada de antibióticos, los resultados discordantes entre ambas técnicas continúan siendo un problema, sobre todo en zonas rurales con escasos recursos técnicos. Mientras que, la microscopía requiere destreza por parte del personal, la tira reactiva muestra baja sensibilidad (Lucy Brookes-Howell et al., 2019). Además, ninguna de estas técnicas determina el perfil de resistencia del microorganismo, y dado que los costes generales de las infecciones urinarias para la sociedad, están relacionadas con la idoneidad del tratamiento empírico (Rosenberg M., 1999; Patton et al., 1991), el dispositivo POC-ITU podría ser la solución para el diagnóstico de ITU en zonas con bajos-medios recursos (*low and middle income settings*), tal y como demandan algunos autores (Schmiemann et al., 2010).

Asimismo, se han desarrollado y comercializado varios dispositivos POC para el diagnóstico de ITU mediante la detección de bacteriuria significativa y/o de la actividad enzimática de los microorganismos a partir de muestras de orina (Baerheim A., 2012; Holm et al., 2015). Respecto a una de estas pruebas POC (Flexicult[®]), el dispositivo POC-ITU de Diagnochip[®] muestra notables ventajas respecto a su homónimo en el mercado. El dispositivo Flexicult[®] proporciona resultados de infección urinaria y antibiograma en 24 horas, casi 18 horas más que el dispositivo POC-ITU. Esto limita la toma de decisiones para el manejo de la ITU en las siguientes 24 horas post-consulta, en lugar del período de tiempo de duración de la misma, que sería lo idóneo. En comparación con la procesabilidad de la muestra e interpretación de resultados, el dispositivo POC-ITU muestra una mayor practicidad y sencillez, ya que el dispositivo Flexicult[®] requiere de personal con cierta destreza o experiencia para la siembra de medios de cultivo, y la interpretación de resultados es controvertida, tal y como describen los usuarios del estudio de Lucy Brookes-Howell et al., 2019 y Guardabassi et al., 2015. En cambio, en el dispositivo POC-ITU, la preparación de la muestra es mínima, y el personal que la realiza no requiere un entrenamiento especializado para la

interpretación de resultados, tal y como recomiendan expertos en POC (Cantón et al., 2017). Por último, destacar la corta vida útil de los medios de cultivo sólidos que emplea el dispositivo Flexicult[®]. Este aspecto, a la larga, conlleva un potencial gasto asociado al mantenimiento de existencias regulares, dificultando la integración de la prueba en el flujo de trabajo diario. La utilización de medios de cultivos deshidratados por parte del dispositivo POC-ITU de Diagnochip[®], aseguraría la viabilidad y el rendimiento de los componentes del dispositivo durante períodos de tiempo más prolongados.

En comparación con un nuevo dispositivo POC comercializado que utiliza un indicador redox para detectar el crecimiento bacteriano (MBS POCT[®]), el prototipo desarrollado por Diagnochip[®] muestra ciertas similitudes y ventajas. La ventaja más importante respecto al MBS POCT[®], es que este último no determina el perfil de resistencia del agente causal de infección urinaria. Por otro lado, una de las limitaciones del MBS POCT[®] es la no detección de recuentos bajos en orina ($<10^5$ ufc/ml) en el mismo tiempo de lectura/interpretación de resultados para el que está definido la prueba (5 horas), teniendo que esperar en estos casos, no menos de 15 horas. En cambio, con el dispositivo POC-ITU las orinas con recuentos bajos, presentaban un resultado positivo en un intervalo de tiempo no superior a las 10 horas, cuando el tiempo para el que está definida su lectura e interpretación de resultados es de 8 horas. Una de las limitaciones que comparten ambos dispositivos, es la imposibilidad de identificar a nivel de género y especie el microorganismo. Sin embargo, el dispositivo POC-ITU mediante los pocillos para la detección de fermentación de lactosa, la categorización Gram de la bacteria (colistina y vancomicina), así como, el reducido grupo de microorganismos causantes de ITU y sus respectivas resistencias intrínsecas (ej. *Klebsiella spp.* - ampicilina; *Proteus spp.* - nitrofurantoína, etc.), pueden proporcionar al clínico datos complementarios con los que ajustar el tratamiento antibiótico en base a la naturaleza del agente infeccioso. Además, el dispositivo MBS POCT[®], lleva asociado a su uso un ordenador y una fuente de alimentación externa, lo que dificulta su integración en entornos donde no hay infraestructura eléctrica, como ocurre en muchos de los países en vías de desarrollo. En cambio, el dispositivo POC-ITU, solo necesitaría de una pequeña incubadora portátil. Finalmente, destacar el elevado valor predictivo negativo (VPN) de ambos dispositivos (96% MBS-POCT[®] vs 94% POC-ITU) para la detección de bacteriuria significativa, lo que permite una exclusión temprana de infección urinaria, con el consecuente impacto positivo en el manejo del paciente, la carga de trabajo del

laboratorio, los costos asociados a pruebas complementarias y el uso racional de los antibióticos.

En contraposición, un nuevo dispositivo que utiliza tecnologías basadas en biosensores funcionalizados con un panel de sondas de DNA (Altobelli et al., 2017), permite detectar bacteriuria significativa con un 98% de correlación, 98% de sensibilidad y un 97% de especificidad. Aunque estos valores son más altos que los obtenidos por el dispositivo POC-ITU, esta tecnología conlleva un gasto económico más elevado y no se podría implantar en zonas con bajos recursos. Además, este dispositivo predice solamente la sensibilidad del microorganismo a ciprofloxacino, mientras que el dispositivo POC-ITU determina el perfil de sensibilidad a siete antibióticos distintos, proporcionando al clínico más alternativas terapéuticas con las que ajustar el tratamiento dirigido en base a las características particulares de cada paciente, y el entorno clínico en que se encuentra.

Aunque es evidente que los dispositivos POC basados en métodos moleculares son más sensibles y específicos, requieren de un instrumental más sofisticado y de personal cualificado. Además, por las propias características operativas de estas técnicas, existe un riesgo elevado de habilitar para su uso a personal sin formación previa en el diagnóstico microbiológico. Esta situación puede generar un uso inadecuado no solo por una incorrecta elección del propio ensayo, sino por el desconocimiento de aquellos factores que van a influenciar de forma directa los resultados proporcionados por dicha prueba.

Equiparando los dispositivos POC disponibles en el mercado para el diagnóstico de infección urinaria, parece que el POCT-ITU podría ubicarse en una posición destacada, gracias a su capacidad de combinar un tiempo analítico corto y una alta precisión, con la identificación presuntiva del agente causal de la infección y su perfil de resistencia antibiótica (*Theranostics*).

En comparación con las pruebas de detección de antígenos, a pesar de que éstas son rápidas, sencillas de realizar y con lectura visual, su sensibilidad está alrededor del 60-80%, no habiendo equivalencia entre distintos sistemas comerciales para un mismo analito y están sometidas a una interpretación subjetiva en muchas ocasiones, generando falsos positivos y falsos negativos (Gimeno et al., 2018). En cambio, con el desarrollo del dispositivo POC-ITU se ha establecido una metodología de trabajo que permitiría reproducir el comportamiento del dispositivo para la detección de bacteriuria significativa, en otros dispositivos médicos con la misma equivalencia, al

fundamentarse principalmente en el empleo de un único analito, el violeta de tetrazolio. Además, la detección visual de crecimiento bacteriano mediante una coloración con un amplio contraste entre su estado inicial (amarillo claro) y estado final (violeta oscuro), evita la interpretación subjetiva del usuario, y por tanto, un posible resultado falseado. No obstante, el dispositivo presenta algunas limitaciones inherentes a los principios analíticos de la técnica. Por ejemplo, ya que el crecimiento bacteriano se detecta a través de un ensayo colorimétrico, en presencia de macro-hematuria franca, el cambio de color estaría sesgado por el color de la muestra y perjudicaría la lectura. Sin embargo, esta condición no se observa de forma frecuente en ITUs no complicadas.

En relación con el antibiograma, la incesante y creciente resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos uropatógenos (Linhares et al., 2015; Bryce et al., 2016; Gupta et al., 2001), dificulta pautar tratamientos empíricos efectivos (Foxman B., 2010; Maki et al., 2001). El dispositivo POC-ITU aporta una notable ventaja respecto a otras técnicas POC, ya que además de determinar la presencia de bacteriuria significativa, permite conocer el perfil de resistencia antibiótica del agente causal a los principales antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de la ITU. El dispositivo POC-ITU mostró una buena correlación para la mayoría de antibióticos respecto al antibiograma convencional, al igual que en otros estudios (Toosky et al., 2020; Mach et al., 2011). Sin embargo, los porcentajes de correlación para amoxicilina/ácido clavulánico, son muy discretos, coincidiendo con los resultados de especificidad, lo que obliga a tomar con cautela los resultados obtenidos por el dispositivo para este antibiótico. No obstante, las discrepancias registradas son falsos positivos (34%), considerándose como un error menor, ya que la trascendencia de estos resultados en el paciente son la de privar al mismo de un tratamiento antibiótico para el que la bacteria podría mostrarse sensible *in vivo*, siendo este hecho preferible, a tratar a un paciente con un antibiótico para el que la bacteria es resistente, y el dispositivo haya indicado susceptibilidad al mismo (error mayor) (U.S. Food and Drug Administration., 2007). La consecuencia de este hecho deriva en una reducción de las alternativas terapéuticas, teniendo que pautarse antibióticos de amplio espectro de forma innecesaria, con la consecuente selección de microorganismos resistentes.

Estos discretos resultados, coinciden con el de otras series publicadas como el trabajo de Guardabassi et al., 2015, o el estudio donde se emplea el dispositivo con indicador redox para la detección de bacteriuria significativa y susceptibilidad antibiótica (Arienzo et al., 2016), el cuál demostró una elevada sensibilidad para la susceptibilidad

a amoxicilina/ácido clavulánico, pero una especificidad muy reducida, con valores predictivos de moderados a bajos. Esto pone de manifiesto la dificultad de conseguir la misma correlación de resultados entre las técnicas POC que incluyen este antibiótico, y las técnicas de referencia.

Asimismo, estos resultados son consecuencia en parte de la desarmonización existente entre las distintas sociedades científicas (*CLSI* y *EUCAST*), en cuanto a las concentraciones críticas de antibiótico que definen las distintas categorías de sensible y resistente de los microorganismos. De hecho, se constata la necesidad de llegar a consensos que unifiquen estos valores (Ferraro MJ., 2001). Mientras que *CLSI* define la concentración de 16 mg/l de ácido clavulánico para estudios de sensibilidad asociados a amoxicilina, *EUCAST* considera que la concentración de 2 mg/l es la concentración idónea de inhibidor de beta-lactamasa que debe asociarse a dicho antibiótico en estudios de sensibilidad *in vitro*. Por otro lado, mientras que *EUCAST* define dos puntos de corte distintos para la detección de resistencias a amoxicilina/ácido clavulánico en función de si el microorganismo es aislado en muestras de orina (32/2 mg/l) u otra muestra clínica (8/2 mg/l), *CLSI* solo define un punto de corte ($\geq 32/16$ mg/l). Esta diversidad de criterios condiciona la elección de la concentración mínima inhibitoria de antibiótico que debe utilizarse en las pruebas POC para la caracterización de resistencias, pudiendo repercutir en los resultados de sensibilidad y especificidad del dispositivo. No obstante, resulta difícil dada la finalidad del dispositivo POC-ITU de cubrir todos los patógenos urinarios habituales, definir una concentración mínima inhibitoria específica para cada especie bacteriana, teniendo que priorizar las concentraciones definidas para el grupo de enterobacterias, y más concretamente para el causante del 80% de las ITU, como es *E.coli* (Stamm WE., 1994).

Los resultados obtenidos para el antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico muestran a su vez, algunas limitaciones del estudio, así como, algunas observaciones o puntos de mejora. Por un lado, como limitación del estudio multicéntrico, cabe destacar que no todos los participantes registraron la prevalencia de enterobacterias productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE). Esta información, hubiese ayudado a esclarecer si las resistencias reconocidas por el dispositivo para amoxicilina/ác. clavulánico, coincide con microorganismos productores de BLEE que mostraron ser sensibles a dicho antibiótico por el método de referencia. No obstante, esto abre otra propuesta de mejora del producto de cara al futuro, pues sería importante incluir en próximas versiones del dispositivo un pocillo para la detección de producción de BLEE.

Esto es algo habitual en los sistemas automatizados usados de rutina en los laboratorios de Microbiología para la caracterización de los principales mecanismos de resistencia. Por ejemplo, la cefalosporina cromogénica (HMRZ-86) o la asociación de cefalosporinas con ácido clavulánico (Calvo et al., 2011). Esto supondría una importante mejora del producto, ya que la resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico en los microorganismos productores de BLEE es variable, considerándose su uso como tratamiento de segunda línea en caso de que el microorganismo sea productor de dicha enzima (Lagacé-Wiens et al., 2006).

Además, teniendo en cuenta que la expresión de resistencias por parte de los microorganismos varía en función del tiempo y el antimicrobiano en estudio, y que la prioridad de los dispositivos POC es obtener resultados en cortos espacios de tiempo, parece ostentoso pensar que la correlación de resultados del antibiograma de un dispositivo POC y de los métodos de referencia sean del 100%. La inclusión no solo de pocillos para la detección de BLEE, sino para otros mecanismos de resistencia de especial interés (carbapenemasas, resistencia a meticilina, etc.) permitiría realizar de forma sencilla lecturas interpretadas del antibiograma, minimizando la distancia entre las técnicas de referencia y las pruebas rápidas en cuanto a la detección de resistencias, con el consecuente impacto clínico y epidemiológico.

En cuanto a los porcentajes de sensibilidad, obtenidos por el dispositivo POC-ITU para los antibióticos ensayados, son en general, más elevados que los de especificidad. Esto implica que el dispositivo muestra una buena capacidad para detectar resistencias bacterianas a los antibióticos.

Como en todos los procedimientos para el diagnóstico de ITU, la muestra de orina debe recogerse de forma estéril, sobre todo si es mediante micción espontánea. El dispositivo POC-ITU no es una excepción a este criterio, mostrando un grado de acuerdo moderado ($\kappa = 0,4$) (Landis et al., 1977) y una especificidad del 94%, para la detección de orina contaminada, siendo esta prestación, otra ventaja del dispositivo respecto a otros POC comercializados (ej. Flexicult[®]) (Blom et al., 2002). De esta manera, se evita tratar de forma innecesaria a un paciente a partir del resultado de una muestra de escaso valor diagnóstico, pudiéndose solicitar una nueva muestra en un espacio de tiempo aceptable. No obstante, conviene interpretar con cautela este resultado cuando el paciente presenta sintomatología clínica, ya que determinados microorganismos uropatógenos como *Proteus spp.*, presentan resistencia intrínseca a colistina y vancomicina (Navarro et al., 2010), pudiendo interpretarse el resultado del dispositivo de forma errónea. Aunque la

valoración conjunta con el pocillo que determina la fermentación de lactosa, ayuda a esclarecer si se trata de una contaminación o una infección (*Proteus spp.* no fermenta la lactosa), consideramos que este parámetro constituye una línea de mejora del producto en el futuro, valorándose la inclusión conjunta de colistina-aztreonam, en el mismo pocillo para inhibir el crecimiento de los microorganismos Gram negativos resistentes intrínsecamente a colistina.

En relación a los distintos entornos de uso del dispositivo, hay que destacar que la utilización generalizada de los POC en las dependencias sanitarias extra-hospitalarias conlleva una reorganización en la práctica clínica, en los flujos de trabajo y en los modelos de asistencia en el entorno de la medicina primaria. Es fundamental, una buena organización logística para crear consultas de alta resolución que permitan a los pacientes irse de la misma con el diagnóstico y el tratamiento correcto, evitando la posterior visita para recoger sus resultados. Esto podría crear la necesidad de personal sanitario responsable de la realización de dichos test en los centros de salud, los cuales deberían de ser instruidos por el personal facultativo de Microbiología.

Entorno hospitalario

Es importante resaltar, que el uso apropiado de los antibióticos no solo se restringe al entorno extra-hospitalario, sino que, a lo largo del tiempo y en distintos ámbitos geográficos, se ha comprobado que la utilización de antimicrobianos en el medio hospitalario es mejorable en el 30-50% de los casos (Apisarnthanarak et al., 2006; Hecker et al., 2003).

Entre las principales causas que acrecientan el mal uso de los antimicrobianos se encuentra, la inseguridad individual del clínico que condiciona una excesiva y evitable presión antibiótica, traducida en tratamientos prolongados innecesarios y espectros de cobertura desproporcionados (Powers JH., 2009). También, las barreras de las propias instituciones sanitarias dificultan la utilización óptima de los antimicrobianos en las mismas (Hulscher et al., 2010). Por ejemplo, la ausencia de Servicios de Microbiología de 24 horas, la organización arquitectónica del centro (complejos hospitalarios sin laboratorio dependientes de un tercero) o cuestiones logísticas (dificultad para la llegada de la muestra al laboratorio), limitan el rápido y correcto procesamiento de las muestras de Microbiología. Ante esta situación, resulta necesario facilitar al personal del entorno

hospitalario, sobre todo, al de las unidades de cuidados intensivos (UCI), nuevas herramientas diagnósticas POC que les permita en cortos espacios de tiempo tomar decisiones terapéuticas proporcionadas, racionales y que generen confianza y seguridad. En esta línea, parece conveniente recordar el significado del concepto “*stewardship*”, que se refiere a la necesidad de cuidar algo que no es propio, como por ejemplo, los antimicrobianos. Son numerosas las intervenciones o estrategias que pueden diseñarse o plantearse para mejorar el correcto uso de dichos fármacos. No obstante, como demuestran los datos de una encuesta nacional dirigida a los miembros de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (Paño-Pardo et al., 2011), la escasez de recursos destinados a reducir el mal uso de los antibióticos es un lastre para llevar a cabo con éxito las distintas estrategias propuestas, como por ejemplo, los denominados Programas de Optimización de Antimicrobianos (PROA).

Los PROA se han desarrollado con el fin de mejorar los resultados clínicos de los pacientes con infecciones, minimizar los efectos adversos asociados a la utilización de antimicrobianos (incluidos las resistencias antibióticas) y garantizar la utilización de tratamientos coste-efectivos (MacDougall et al., 2005). Para cumplir con estos objetivos, los Servicios directamente implicados, necesitan de recursos humanos y materiales, redistribuyendo en caso de necesidad, las tareas entre los distintos Servicios según la carga asistencial de cada uno. Por ello, con el fin de facilitar esa labor y poder cumplir con las directrices del PROA, resulta realmente atractivo incluir en dichos programas, la utilización de pruebas POC que permitan descentralizar el diagnóstico microbiológico a las distintas Áreas y Servicios hospitalarios para asegurar el uso racional de los antimicrobianos. Además, puesto que la información incluida en el antibiograma es de gran utilidad para las estrategias de mejora en el uso de antibióticos, el disponer de dicha información en cortos espacios de tiempo, ayudaría a evitar tratamientos empíricos potencialmente prolongados con antimicrobianos de amplio espectro, y detectar mecanismos de resistencias, que obligasen a implementar las medidas de control pertinentes.

Entre los Servicios hospitalarios donde la realización de pruebas en el punto de cuidado para la determinación de sensibilidad a los antimicrobianos juega un papel fundamental, se encuentran las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Los Servicios de Medicina Intensiva, tienden a prescribir terapias combinadas de antimicrobianos durante períodos prolongados. Este hecho, está más que justificado en pacientes críticos. No obstante, se ha demostrado que el tratamiento antibiótico inadecuado se asocia a una mayor estancia

en UCI con el consiguiente coste asociado (Garnacho-Montero et al., 2008). Además, en estos pacientes resulta difícil diferenciar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) de origen infeccioso, del no infeccioso (Heffner et al., 2010). Por ello, es necesario desarrollar medidas o estrategias que permitan mejorar la prescripción antibiótica en estos pacientes de difícil manejo. No cabe duda, que disponer de herramientas diagnósticas POC basadas en el empleo de reactivos cromóforos, capaces de detectar resistencias bacterianas en el punto de atención del paciente, ayudaría a adecuar el tratamiento empírico, a suspender tratamientos en ausencia de procesos infecciosos, favorecer el tratamiento dirigido con antibióticos de espectro reducido y evitar tratamientos innecesariamente prolongados.

Entorno doméstico

El tercer entorno donde los dispositivos POC pueden tener especial interés, es el ámbito doméstico. Si bien, el diagnóstico de ITU no conlleva un impacto socialmente importante, el diagnóstico de otras patologías, como por ejemplo el VIH, si implica un mayor impacto emocional y social. La posibilidad de realizar estas pruebas “en casa”, en un entorno más privado, puede proporcionar mayor satisfacción al paciente. El objetivo de la realización de un auto-diagnóstico de infección urinaria por parte del paciente, ayudaría a reducir la carga asistencial en los centros sanitarios, a realizar un primer despistaje, con la posibilidad de una rápida consulta al especialista sanitario y evitar el impulso inicial de la toma de antibióticos. No obstante, la ejecución de dichos test en el entorno domiciliario, requiere de instrucciones claras y muy sencillas sobre la realización e interpretación de resultados.

Ancianos

La ITU es la infección bacteriana más prevalente en los pacientes de edad avanzada, siendo *E.coli*, el principal agente causal (Linhares et al., 2013). Además, el diagnóstico en estos pacientes puede ser problemático, ya que se trata de un grupo poblacional que tiene características diferenciales respecto a los pacientes más jóvenes, y suelen manifestar la sintomatología clínica de una forma más silente pero, a la vez, más intensa.

Se trata de un grupo poblacional, en donde el incremento de la incidencia de bacteriuria asintomática, y la dificultad de realizar un correcto diagnóstico, están favoreciendo que más del 50% de los antibióticos prescritos en este grupo etario, sea innecesario (Lutters et al., 2008; Lim et al., 2014; McMurdo et al., 2000). Asimismo, y teniendo en cuenta la mayor comorbilidad de estos pacientes, y consecuentemente la necesidad de politerapia, es fácil que aparezcan reacciones medicamentosas adversas por el uso combinado de varios fármacos.

Además, algunos estudios han demostrado que los pacientes mayores de 65 años con un diagnóstico de ITU en la comunidad, tienen un riesgo significativamente mayor de bacteriemia cuando el tratamiento con antibióticos no ha sido prescrito de forma inmediata (Gharbi et al., 2019).

Teniendo en cuenta estas premisas, parece lógico pensar que una de las principales poblaciones dianas del dispositivo POC-ITU, podrían ser los ancianos. La capacidad del mismo para detectar ITU y las resistencias del agente causal en un corto espacio de tiempo, permitiría iniciar un tratamiento precoz con el que reducir la aparición de complicaciones especialmente graves como la sepsis, en un grupo, que por sus comorbilidades, podría tener un fatal desenlace.

Finalmente, los conocimientos adquiridos a lo largo del desarrollo de dicho dispositivo, son de gran utilidad para otros novedosos enfoques terapéuticos relacionados de forma directa con infecciones potencialmente graves como la sepsis y la meningitis. En concreto el empleo de dispositivos con reactivos cromóforos, puede fomentar el desarrollo de nuevas tecnologías capaces de proporcionar datos tan valiosos, como el perfil de resistencia antibiótica de un microorganismo, en un corto espacio de tiempo, siendo de vital importancia en infecciones potencialmente mortales como la meningitis o la sepsis. Se detallan estos enfoques en el apartado “líneas de actuación futura”.

5.4.- ANÁLISIS DE LAS SOLUCIONES PROPUESTAS EN PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO

En relación al diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria en países en vías de desarrollo, se ha diseñado, fabricado, desarrollado, ajustado y validado “*in vivo*” un

nuevo sistema *Point of Care* para el diagnóstico de ITU basado en el empleo de reactivos colorimétricos, capaces de detectar el crecimiento bacteriano en micro-pocillos impregnados con distintos antibióticos comúnmente usados en el tratamiento de la ITU, y consecuentemente, la sensibilidad del microorganismo a dichos antibióticos. De esta manera, se aporta ventajas notables como, la posibilidad de diagnosticar en zonas rurales, una infección tan prevalente como la ITU, además de pautar un tratamiento dirigido, evitando posibles fracasos terapéuticos, y en consecuencia, el incremento de las resistencias bacterianas y el consumo antibiótico.

El desarrollo explosivo y continuo de los dispositivos POC, camina de forma paralela al de los avances tecnológicos recientes, lo cual ha permitido ampliar el diagnóstico microbiológico a lugares remotos, en los cuáles, los laboratorios clínicos no podrían llegar a complementar la asistencia de éstos en situaciones en los que la demora derivada del transporte de la muestra y la llegada del resultado puede ser importante, cuándo no crítica. El ámbito de aplicación de los dispositivos POC, no solo debe abarcar las urgencias hospitalarias, los centros asistenciales con menores prestaciones, las consultas médicas y de enfermería, sino también las poblaciones de lugares geográficamente remotos, o lo que se conoce como "desiertos microbiológicos".

Teniendo en cuenta este incesante advenimiento de nuevas pruebas microbiológicas POC, debe de aprovecharse para promocionar y fomentar la puesta en marcha de los denominados "Laboratorios POC". Estos espacios que aglutinan la realización de pruebas rápidas y sencillas, podrían aplicarse en zonas marginales de países con bajos o moderados recursos económicos, y garantizar el acceso de los ciudadanos a aquellos avances diagnósticos que mejoren su salud, tal y como ocurre en los países de economía más próspera.

Desde el punto de vista de costes, al tratarse de metodologías simples que no requieren de grandes inversiones, y cuyo precio suele ser reducido, o tiende a serlo con el tiempo y la evolución del mercado, los dispositivos POC reducen la factura del diagnóstico microbiológico. Asimismo, hay que esperar una reducción de costes asociados a la simplificación de los procesos y a los derivados de la formación de personal.

Los dispositivos POC tienen la etiqueta teórica de ser coste-efectivos. Este hecho, resulta especialmente importante en países con recursos económicos escasos, por lo que al análisis coste-efectivo, hay que añadir la oportunidad de realizar la intervención. Por ejemplo, una misma prueba puede ser coste-efectiva en Estados Unidos, con grandes

recursos y baja prevalencia, pero no en Zanzíbar, en donde se da la situación inversa y dicha prueba POC debe competir con otras estrategias diagnósticas.

Para evaluar un dispositivo POC, en primer lugar, hay que comprobar su eficacia, y además, debe tenerse en cuenta la prevalencia de la infección, ya que pequeñas diferencias en la sensibilidad diagnóstica entre dos dispositivos POC pueden llevar a resultados muy distintos de efectividad si se aplican en grupos de pacientes en los que la infección es infrecuente. De hecho, mucha de las evaluaciones que aparecen en la ficha técnica de muchos dispositivos, se han realizado en poblaciones o entornos no superponibles para los que está diseñado la técnica. Además, otros factores de interés en la validación de un dispositivo POC son los factores geográficos y culturales, ya que el tiempo de espera por los resultados puede ser aceptable en unos grupos de pacientes, y en otros no. Por ello, la OMS recomienda los criterios ASSURED (Huppert et al., 2010) (asequible económicamente, sensible, específico, fácil de usar, rápido, instrumentación sencilla y accesible para toda la población).

Con el fin de evaluar las prestaciones del dispositivo POC-ITU en un entorno de escasos recursos económicos, con una prevalencia de ITU mayor que en países desarrollados (Dalet et al., 1997) y justificar el cumplimiento de los criterios ASSURED que demanda la OMS, se llevó a cabo una validación a “pie de campo” en Stone Town, capital de Zanzíbar. A pesar de las limitaciones para una completa y exhaustiva evaluación como consecuencia de la ausencia de técnicas de referencia para determinar la correlación entre el antibiograma convencional y el antibiograma del POC-ITU, el dispositivo mostró un elevado grado de correlación (98%) con el *gold standard* para el diagnóstico de infección urinaria.

Esta población rural y remota, tenía muchas de las características típicas reportadas previamente en la comunidad, como por ejemplo, infección urinaria adquirida incluyendo una preponderancia de pacientes femeninas, y una alta prevalencia de infección por *E.coli*.

De hecho, el 91% de los pacientes que presentaban clínica compatible con ITU, eran mujeres. En este grupo poblacional, la detección de bacteriuria significativa presenta tanto interés en pacientes con sintomatología manifiesta, como en mujeres embarazadas asintomáticas, ya que en estas últimas, el riesgo de desarrollar pielonefritis es mayor (Dalet et al., 2002). Teniendo en cuenta estas circunstancias, el dispositivo POC-ITU sería una herramienta muy importante para el cribado de la bacteriuria asintomática de la mujer embarazada, ya que en estos países la falta de recursos dificulta que se lleve a

cabo una correcta detección de las principales complicaciones que puede sufrir la mujer durante el período gestacional.

Teniendo en cuenta la escasez de antibióticos en estos entornos tan desfavorecidos, resulta de gran importancia que la técnica diagnóstica muestre un elevado valor predictivo negativo para la detección de bacteriuria significativa, y reservar estos medicamentos para pacientes que realmente lo necesiten. El dispositivo POC-ITU de Diagnochip® descartó ITU en un 82% (70/85) de los pacientes, evitando de esta manera un tratamiento antibiótico innecesario, y consecuentemente, un consumo antibiótico que podría privar del mismo a pacientes que presentan un verdadero proceso infeccioso.

Asimismo, destacar que el personal sanitario de este entorno, mostró una rápida adaptación al manejo e interpretación de resultados del dispositivo. Esto es importante desde el punto de vista de la educación médica, ya que a diferencia de lo que ocurre en países desarrollados, donde se pone un fuerte énfasis en la historia clínica para el diagnóstico, el personal sanitario de entornos con pocos recursos, generalmente no han tenido esta oportunidad educativa, y su juicio diagnóstico depende en gran medida de la información que les pueda proporcionar el dispositivo POC (Ramani S., 2004).

En esta línea, y a pesar de la existencia de Fundaciones de ayuda humanitaria, sería importante buscar recursos con los que sufragar el desplazamiento y la formación del personal sanitario de países subdesarrollados, en entornos sanitarios más avanzados con el fin de que adquieran las habilidades y destrezas necesarias, para el manejo y la prevención de enfermedades infecciosas en sus países de origen.

El dispositivo POC-ITU, al no requerir una inversión económica elevada, y mostrar globalmente una elevada sensibilidad y especificidad para la mayoría de variables evaluadas, su uso, podría suponer, una importante reducción del gasto asociado al diagnóstico de ITU en países en vías de desarrollo, y ayudar a recorrer la "última milla" de la atención al paciente.

Finalmente, nuestro estudio a "pie de campo", refleja la validez del dispositivo POC-ITU para la detección de bacteriuria significativa. Al disponer de esta tecnología, se puede ofrecer al mercado un dispositivo médico validado, certificado, listo para usar y que no requiere de equipamiento sofisticado, tal y como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS). Su bajo coste, permitiría abrir una vía de esperanza en países con grandes desigualdades sociales, donde gran parte de la población, difícilmente puede acceder a un laboratorio de Microbiología.

5.5.- ANÁLISIS DE LAS SOLUCIONES PROPUESTAS PARA LA REDUCCIÓN DEL CONSUMO DE ANTIBIÓTICOS

Es bien conocido, que la resistencia a los antibióticos, impulsada por el consumo excesivo de los mismos, especialmente en los países subdesarrollados, es una amenaza creciente para la salud pública mundial (Laxminarayan et al., 2016; Lim et al., 2016). La tasa de consumo antibiótico en los países con bajo poder adquisitivo, ha estado aumentando hasta el punto de equipararse, con los países que disfrutaban de economías más solventes. Sin embargo, las desigualdades en el acceso a los antibióticos persisten, ya que muchos países en vías de desarrollo continúan con altas tasas de mortalidad como consecuencia de las enfermedades infecciosas (Eili et al., 2018).

Por ello, existe la necesidad de una vigilancia global del consumo de antibióticos para apoyar políticas que regulen la prescripción y el consumo de los mismos, y consecuentemente, se minimicen las resistencias bacterianas a estos medicamentos, que tantas vidas salvan.

Entre 2000 y 2015, el consumo de antibióticos, expresado en dosis diarias definidas (DDD), aumentó un 65%, y la tasa de consumo de antibióticos lo hizo en un 39%. El aumento fue impulsado por los países de bajos y medianos ingresos, donde el aumento del consumo se correlacionó con el crecimiento del producto interior bruto per cápita (Eili et al., 2018). Y es que, el crecimiento económico brinda acceso a bienes y servicios, incluidos los antibióticos, lo que explica la más que probable relación positiva encontrada entre el aumento de la riqueza y el aumento del consumo de antibióticos en los países más desfavorecidos. Por ello, ante este esperanzador crecimiento económico en los países subdesarrollados, y las elevadas tasas de consumo antibiótico, conviene fomentar el desarrollo de nuevos dispositivos POC de bajo costo, que puedan ayudar a revertir estas desorbitadas cifras de consumo antibiótico e indirectamente, reducir el incremento de las resistencias bacterianas.

Sin cambios en la política antibiótica actual, la proyección del consumo mundial de antibióticos en 2030, se incrementará un 200% (Eili et al., 2018). Reducir el consumo global es fundamental para disminuir la persistente amenaza de resistencia a los antimicrobianos. No obstante, los esfuerzos deben equilibrarse entre limitar el acceso a

los antimicrobianos, el conocimiento de los patrones locales de resistencia y aumentar la oferta de herramientas diagnóstica en el punto de cuidado del paciente. Haciendo hincapié principalmente en este último aspecto, cabe destacar, que la inclusión del dispositivo POC-ITU de Diagnochip[®] en el mercado, podría ayudar a revertir esta situación, dado que en pocas horas el personal sanitario podría descartar de forma eficiente un proceso infeccioso y consecuentemente, evitar pautar un tratamiento antibiótico innecesario, que fomentase, el incremento de estas devastadoras cifras de consumo antibiótico.

A pesar de la aparición y propagación de infecciones casi intratables, la respuesta global a esta crisis de salud pública sigue siendo lenta e inadecuada. Se necesita con urgencia reducir las tasas de consumo antibiótico en los países subdesarrollados, y ralentizar el crecimiento de resistencias a los mismos. Por ello, es necesario desarrollar e invertir en dispositivos médicos de bajo costo, e implementar mecanismos innovadores de fijación de precios para mejorar el acceso a los medicamentos con el fin de ayudar a frenar este incesante y creciente problema de salud pública a nivel mundial.

Los esfuerzos para reducir el uso innecesario o inadecuado de antibióticos mediante campañas de concienciación, han disminuido las tasas de consumo en algunos países desarrollados (Sabuncu et al., 2009). Sin embargo, mantener esos esfuerzos a largo plazo ha resultado ser un desafío (Institut de veille sanitaire (InVS), 2015; Shekarchian et al., 2016), y los métodos utilizados pueden no ser apropiados o factibles en los países en vías de desarrollo. En consecuencia, existe la urgente necesidad de investigar, para encontrar los métodos más efectivos e implementarlos en los programas nacionales de optimización de antibióticos, sobre todo, en los países más desfavorecidos. Teniendo en cuenta la dificultad de estos países para llevar a cabo campañas sobre el uso racional de antibióticos, entre las posibles soluciones se encontraría el uso de dispositivos médicos POC que detectasen, mediante rápidos resultados, la existencia o ausencia de un proceso infeccioso, y permitiesen al usuario prescindir o no, de la toma de antibióticos.

Por otro lado, las diferencias en las tasas de consumo se deben también en parte a las normas sociales y culturales (Blommaert et al., 2014). Y es que, a pesar de proporcionar al personal clínico herramientas POC que les permita descartar una infección bacteriana en cortos espacios de tiempo, hay especialistas que consideran que la mejor manera de prevenir las resistencias bacterianas, y por tanto, el mejor mensaje de salud que se puede transmitir, es cumplir con la pauta antibiótica prescrita inicialmente (Lucy Brookes-Howell et al., 2019). Por lo tanto, incorporar el uso juicioso como un valor normativo en

los países en vías de desarrollo, podría evitar en el futuro, el uso inapropiado de los antibióticos, tal y como ocurre en los países desarrollados. Además, comprender los factores que determinan tasas de consumo antibiótico más bajas en algunos países desarrollados, puede ayudar a integrar futuras soluciones políticas en los países de economía más precaria.

Asimismo, se debería de plantear si los futuros esfuerzos de investigación deberían de centrarse en cuantificar el beneficio costo-efectivo de las inversiones en dispositivos POC en países subdesarrollados, en relación con las inversiones en el descubrimiento de nuevos antibióticos.

Finalmente, al igual que con el cambio climático puede haber un punto de inflexión desconocido (Lenton et al., 2008), podríamos estar en la antesala de un futuro sin antibióticos efectivos. Incluso en ausencia de puntos de inflexión, la disminución de la efectividad de los antibióticos representa una gran amenaza para la salud pública mundial. Es necesario replantear radicalmente las políticas de consumo antibiótico, y valorar la realización de grandes inversiones en herramientas de diagnóstico rápido para prevenir el uso inadecuado de los mismos, sobre todo, en países subdesarrollados.

5.6.- ANÁLISIS DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA

Los factores socioeconómicos están motivando el crecimiento de la industria del desarrollo de dispositivos médicos orientados a aportar nuevas y más eficientes soluciones diagnósticas y terapéuticas a las ya existentes. Por ello, es necesario estructurar este crecimiento de forma adecuada utilizando metodologías sistemáticas de desarrollo de productos, adaptadas a las necesidades de desarrollo de dispositivos médicos.

Es importante resaltar, que en los proyectos de desarrollo de dispositivos médicos, existen numerosos factores adicionales que condicionan la viabilidad del dispositivo. Sin embargo, el uso de metodologías de desarrollo sistemáticas y estructuradas, el seguimiento de las normativas y la adecuada comunicación inter-disciplinar puede asegurar la obtención de productos finales eficaces y seguros, con los que satisfacer las necesidades sociales.

La metodología para el desarrollo de dispositivos médicos basados en el empleo de sustancias cromóforas, surge como consecuencia de los aprendizajes adquiridos en las investigaciones y desarrollos presentados. Se apoya también en estudios previos sobre metodologías estructuradas para el desarrollo sistemático de productos y sobre los principales requisitos adicionales que caracterizan a los dispositivos médicos. El análisis comparativo realizado sobre las aplicaciones de estos reactivos y la consulta de numerosos documentos asociados a dichos desarrollos ha contribuido también a incorporar detalles adicionales a la metodología propuesta.

En esencia se trata de una adaptación o actualización de las metodologías sistemáticas y estructuradas, en base a la inclusión de importantes consideraciones que pretenden facilitar el proceso de desarrollo de dispositivos médicos basados en el empleo de reactivos cromóforos.

Está especialmente enfocada a la obtención de prototipos de nuevos dispositivos médicos “*lab on a chip*”, fruto de proyectos de investigación, que alcancen la fase previa a la puesta en producción y comercialización. En el caso de que dichos desarrollos se lleven a cabo dentro de universidades o centros de investigación, la comercialización puede acometerse mediante diversas alternativas, como son la licencia de los derechos de propiedad intelectual a empresas del sector, la creación de empresas con base tecnológica o la colaboración directa con una empresa en el proyecto de desarrollo del dispositivo.

Tales proyectos se benefician del establecimiento de equipos de trabajo multidisciplinares, si bien resulta adecuado potenciar la docencia en temas de Bioingeniería que contribuyan a suplir las necesidades de personal del sector, así como a facilitar la comunicación en proyectos de este tipo.

El empleo de tecnologías de diseño, cálculos y fabricación asistidos por ordenador, junto a la realización de prototipos que acompañen a las principales tomas de decisiones de este tipo de proyectos, ha mostrado ser de gran ayuda por lo que se ha propuesto su utilización de forma intensiva.

En relación con la metodología desarrollada para la validación clínica del dispositivo POC-ITU, cabe destacar algunas limitaciones u observaciones. El dispositivo POC-ITU está desarrollado para trabajar con orinas de reciente recolección por parte del paciente. Para los ensayos clínicos, se trabajó con orinas de pacientes que se conservaron en refrigeración (4°C) durante 18 horas antes de ser testadas con el dispositivo POC-ITU, con el fin de seleccionar aquellas, que tras la valoración del urinocultivo, tuviesen un

recuento significativo de $>10^5$ ufc/ml. Esta práctica, necesaria por la dinámica de trabajo y del ensayo, no es lo habitual en un laboratorio de Microbiología, donde se recomienda por norma general, que las muestras se procesen en las dos primeras horas tras la recogida de la misma (García-Sánchez et al., 1993). Esto puede afectar a los resultados del ensayo, en todo caso, penalizando los resultados del dispositivo, ya que no se inoculó con muestras de orina de reciente recolección, como sí sucedió con el urinocultivo. Por ello, el dispositivo registró 8 falsos negativos para la determinación de bacteriuria significativa, y esto puede deberse al retraso del procesamiento de la muestra, y la consecuente pérdida de viabilidad de las bacterias en orina.

Asimismo, no se valoró si los pacientes de las muestras de orina sometidas a ensayo, habían tomado tratamiento antibiótico antes de la recogida de la misma. Esto es un factor a tener en cuenta, dado que las muestras de orina que van a ser testadas con el dispositivo POC-ITU, son previamente diluidas, y esto puede conllevar una importante transferencia de antibióticos, a diferencia de las muestras que son inoculadas directamente en el urinocultivo (Arienzo et al., 2019). No obstante, esto podría tener una interpretación controvertida. Por un lado, el conocimiento de que el paciente ha sido tratado empíricamente con antibióticos y presenta un resultado negativo en el dispositivo POC-ITU, podría interpretarse como ausencia de infección tras una terapia antibiótica exitosa, mientras que un resultado positivo del dispositivo, podría significar fracaso terapéutico de la terapia empírica, advirtiendo al médico de la necesidad de cambiar el tratamiento, en base a la nueva información que aportaría el antibiograma del dispositivo POC-ITU.

Para la validación técnica del dispositivo POC-ITU, se llevó a cabo un estudio multicéntrico en el que participaron distintos hospitales españoles. Consideramos que entre las ventajas que aportó este tipo de estudio al desarrollo del dispositivo, fue sobre todo, la obtención de grandes tamaños de muestra, así como, una mayor calidad y relevancia científica. Sin embargo, obligó a una mayor rigurosidad metodológica y un mayor control de la calidad en la recolección de datos. Como posible limitación del estudio, destaca la falta de homogeneidad en el tamaño muestral (N) de algunas de las variables evaluadas, como por ejemplo, los datos de sensibilidad de algunos antibióticos. Esto es debido a la diferente política antibiótica que practica cada centro, así como a la diversidad de las resistencias locales que obliga a informar unos antibióticos u otros, y a la diferencia en el número de ensayos realizados por cada hospital.

Por nuestra experiencia, trabajando con este tipo de proyectos, a pesar de conseguir un mayor impacto, requirió de un gran esfuerzo en la corroboración de las bases de datos de los distintos centros para su posterior cálculo estadístico. Sin embargo, con la participación de investigadores con experiencia en el campo, y con iniciativa por elaborar estrategias frente a los problemas de salud pública, este tipo de estudios constituye una gran oportunidad para romper las barreras de la distancia y facilitar el entusiasmo emprendedor de los jóvenes investigadores.

5.7.- ANÁLISIS DE LOS MATERIALES EMPLEADOS

La decisión de utilizar material plástico, para el desarrollo de un dispositivo POC para el diagnóstico de ITU, estuvo motivada además, de por ciertas ventajas asociadas a su empleo respecto a otras alternativas más convencionales, por la necesidad de ofrecer a los mercados con bajo poder adquisitivo, cómo el de los países no industrializados, un dispositivo médico asequible económicamente. Además, su capacidad de producción a gran escala es otro punto a favor dada la utilización máxima de la producción. En nuestro caso, el diseño se orientó a la fabricación por inyección empleando termoplásticos, lo que permitiría obtener series largas (1.000-100.000 réplicas) de forma rápida y económica.

Igualmente, y condicionado por las distintas etapas de progreso y perfeccionamiento del dispositivo, se reemplazó la primera versión del material plástico de cuerpo opaco por una versión del mismo de cuerpo translúcido. Consideramos que esta decisión fue un acierto dado que se mejoró la calidad de la lectura e interpretación de resultados del dispositivo.

Por otro lado, el desarrollo de pruebas rápidas ha sido uno de los puntos de mayor interés en el campo de la Microbiología en los últimos tiempos. La reducción de los tiempos de respuesta y el impacto clínico y socio-económico parecen ser causas más que justificadas para potenciar este sector (Cantón et al., 2017). Esta idea progresista, motivó el empleo de reactivos tipo cromóforos como el violeta de tetrazolio, que acoplados en un sistema *Point of Care*, permitiesen al usuario obtener en un corto espacio de tiempo, datos clínicos con los que tomar la decisión clínica correcta y evitar gastos adicionales.

El empleo de estos reactivos se ha extendido de forma considerable, siendo la herramienta fundamental con la que reducir la dependencia del cultivo bacteriológico, el gran caballo de batalla de la Microbiología por su inamovible período de incubación de al menos 24 horas. El uso de estos reactivos está llamado a marcar un antes y un después en el desarrollo de las futuras pruebas microbiológicas. De hecho, ya existen técnicas rápidas basada en el empleo de reactivos cromóforos como el Rapid ResaPolymyxin[®], que utiliza la resazurina como marcador de genes de resistencia a las polimixinas (Lescat et al., 2019) o el uso del violeta de tetrazolio para la detección de resistencias antibióticas en *Pseudomonas spp.* (Tunney et al., 2004).

A pesar de que el urinocultivo, continúa siendo el método de referencia para el diagnóstico de ITU en un laboratorio de Microbiología (Schmiemann et al., 2010), puede tener una demora en el resultado de >48 horas. Independientemente de la idoneidad de sus resultados diagnósticos, esta dilación en el tiempo origina una pérdida de interés por parte del facultativo que ha solicitado la prueba, obligándolo a tomar decisiones terapéuticas, preventivas o clínicas que pueden ser erróneas (Cantón et al., 2017). Esto puede derivar en un coste económico innecesario, ya sea por pautar un tratamiento antibiótico prescindible, solicitar el ingreso del paciente o demandar más pruebas diagnósticas. Por ello, consideramos que el empleo de reactivos cromóforos, podría ayudar a reducir estos desaciertos.

En relación a los antibióticos seleccionados, se ha priorizado además de los antibióticos de elección en el tratamiento de la ITU, aquellos que se administran vía oral. Y es que, la administración vía oral de un medicamento conlleva notables ventajas. Por un lado, la reducción de costes derivados de no ingresar al paciente para una terapia vía parenteral, los problemas que se derivan de la necesidad de un acceso venoso para la administración del tratamiento antimicrobiano, y por último, y no menos importante, la comodidad posológica del paciente. No obstante, la posibilidad de incluir en el dispositivo nuevos antibióticos no queda limitada a estos criterios, pues los conocimientos adquiridos durante el desarrollo del dispositivo, se pueden extrapolar a otros antibióticos, con el fin de ampliar el catálogo de dispositivos POC en base a las resistencias locales y a otros síndromes infecciosos. Se detallan estos enfoques en el apartado “líneas de actuación futura”.

5.8.- LÍNEAS DE ACTUACIÓN FUTURA

Sin lugar a dudas el campo de las pruebas *Point of Care* seguirá creciendo en los próximos años. El desarrollo tecnológico, hará posible contar con pruebas diagnósticas cada vez más rápidas, sensibles y específicas. Es esperable contar con sistemas y equipos de tamaño más reducido y capaces de reducir el factor humano al mínimo. Existe también una tendencia a implicar al propio paciente en su cuidado, en este sentido ya se han desarrollado pruebas diagnósticas capaces de ser realizadas mediante teléfonos inteligentes, tal y como demuestra el estudio de Isabel P. Alves et al., 2019, donde se informa por primera vez de un inmunoensayo óptico de fluorescencia microfluídica basado en un teléfono inteligente capaz de cuantificar *E. coli* en tampón y orina sintética en menos de 25 minutos sin preparación ni concentración de la muestra; o el sistema de cartuchos para la detección de ITS desarrollado por los investigadores de la Universidad Johns Hopkins que permite conectarse vía Bluetooth a un teléfono móvil (MobiNAAT) utilizando tecnología LAMP, proporcionando resultados en menos de una hora y una alto grado de correlación con la técnica de referencia (Rodríguez et al., 2019).

Las nuevas pruebas basadas en teléfonos inteligentes tienen el potencial de ser una prueba rápida en el punto de atención del paciente, pudiendo detectar infecciones urinarias, lo que ayuda a detener la prescripción excesiva de antibióticos. Asimismo, pueden ayudar a detectar y monitorizar pacientes con otras enfermedades infecciosas transmisibles asintomáticas, cortando la cadena de transmisión rápidamente.

El empleo de la microfluídica permitirá reducir la complejidad de los ensayos microbiológicos, aumentar el número de patógenos detectables en un mismo ensayo, y ayudará a reducir el gasto por prueba de laboratorio. Por otro lado, el reducido tamaño de los sistemas de procesamiento y/o lectura facilitará su implementación en entornos remotos. Otro campo de desarrollo importante es la identificación de marcadores, no relacionados con el microorganismo, que se relacionen con el estado de infección, o capaces de diferenciar infección de origen viral de bacteriana. Algunos de estos marcadores (proteína C-reactiva, procalcitonina, proteína-10 inducible por interferón, etc.) resultan muy prometedores y es esperable que se desarrollen pruebas POC, capaces de detectarlos.

Es por tanto, un reto para la Microbiología Clínica definir la mejor manera de incorporar el diagnóstico *Point of Care*. Es importante destacar el papel de los laboratorios de Microbiología, no solo en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, sino en la vigilancia epidemiológica, lo que constituye un papel fundamental para la toma de decisiones clínicas y de salud pública, permitiendo conocer la epidemiología de los microorganismos, los determinantes de resistencia a los antimicrobianos o la identificación y notificación de brotes o enfermedades de declaración obligatoria. El empleo de pruebas rápidas o POC, centralizado o no, debe asegurar en cualquier situación el mantenimiento de estas funciones, así como conservar los más altos estándares de eficiencia, calidad y seguridad garantizados hasta ahora, en los laboratorios de Microbiología Clínica.

Como aportación adicional de la Tesis Doctoral se incluyen en este apartado ciertas necesidades detectadas, para potenciar el empleo de los reactivos cromóforos en el desarrollo de dispositivos médicos *Point of Care*. Pueden servir también de ayuda a cualquier investigador que quiera profundizar en los distintos aspectos desarrollados en las investigaciones presentadas.

5.8.1.- Actuaciones futuras en relación a los materiales estudiados

Las siguientes propuestas de actuación futura pueden fomentar el empleo de los reactivos cromóforos investigados para el desarrollo de nuevos dispositivos médicos que se beneficien de las capacidades de detección y actuación que estos reactivos aportan. Se detallan a continuación dichas líneas de investigación.

~ Se pueden desarrollar nuevos dispositivos médicos para la detección de infección en otras muestras clínicas (líquidos estériles, sangre,...) que permitan realizar labores diagnósticas para otras patologías. Los conocimientos adquiridos como consecuencia de las investigaciones presentadas en relación al dispositivo para diagnóstico de ITU, basado en el empleo de reactivos cromóforos, serán de gran ayuda para dichos fines.

~ Resulta importante para ello, el empleo de herramientas de simulación que acompañen al proceso de diseño y permitan analizar las posibilidades de dichos

dispositivos para evaluar los efectos del cambio de consistencia de las nuevas muestras biológicas (ej. LCR) a emplear.

~ Es también interesante continuar analizando distintos procedimientos para mejorar la estabilidad y vida media de dichos reactivos frente a agentes externos como la temperatura, luz o la humedad. Dichas mejoras proporcionarán una mayor vida útil a los dispositivos resultantes.

~ Asimismo es también interesante estudiar en más detalle, el empleo de aditivos y excipientes que optimicen el rendimiento y la vida media de los dispositivos.

~ En cualquier caso es importante analizar los efectos del envejecimiento de estos reactivos sobre las propiedades de detección de bacteriuria significativa y sobre la capacidad de los dispositivos de llevar a cabo su misión a largo plazo.

~ El empleo de tecnologías de fabricación de circuitos integrados, para la obtención de los elementos destinados al acondicionamiento de los reactivos del dispositivo, puede ser de gran ayuda para la reducción de la carga asistencial de la fabricación de los dispositivos. También puede permitir una fabricación en serie más económica y la incorporación de tareas adicionales que potencien el éxito industrial de dichos desarrollos.

~ Es especialmente importante utilizar herramientas “CAD-CAE-CAM”, como apoyo al proceso de diseño y tecnologías de prototipado rápido, en combinación con otras tecnologías de fabricación y microfabricación, como soporte en la fabricación de prototipos que acompañen a las etapas de desarrollo y permitan estudiar diferentes aspectos de interés.

~ Es necesario continuar profundizando en el perfeccionamiento y uso de nuevos antibióticos con lo que se potenciará la aplicación de estos dispositivos médicos en otros síndromes infecciosos y en la oferta de un catálogo más amplio de dispositivos, que pueda ser de mayor interés en unas áreas geográficas u otras, en base a las resistencias antimicrobianas locales.

5.8.2.- Actuaciones futuras en relación con la patología estudiada

~ En relación con la ITU, resultaría de interés llevar a cabo un estudio clínico a gran escala en un país en vías de desarrollo utilizando el dispositivo diagnóstico desarrollado. Esto permitiría proporcionar un análisis coste-beneficio detallado y profundizar en las prestaciones del dispositivo sobre su “verdadero terreno”.

~ En relación con la meningitis bacteriana, resultaría muy positivo el desarrollo de nuevos dispositivos, que permitan diagnosticar y determinar, el perfil de resistencia de los principales microorganismos causantes de meningitis bacteriana, mediante reactivos cromóforos. Para ello, y teniendo en cuenta la diferente etiología de la meningitis bacteriana respecto a la ITU, habría que ensayar nuevos medios de cultivo y antibióticos.

~ En relación con la bacteriemia, resultaría muy positivo el desarrollo de nuevos dispositivos, que permitan diagnosticar y determinar, el perfil de resistencia de los principales microorganismos causantes de sepsis, mediante reactivos cromóforos. Para ello, y teniendo en cuenta la diferente etiología de la bacteriemia respecto a la ITU, habría que ensayar nuevos medios de cultivo y antibióticos.

~ Tras un ajuste adecuado de los dispositivos inicialmente en base al empleo de herramientas de simulación y ensayos “*in vitro*”, de cara a la realización de pruebas “*in vivo*” que ayuden a evaluar la eficacia diagnóstica y terapéutica de los dispositivos desarrollados, es importante la realización de estudios multicéntricos.

~ Sería de gran utilidad acometer nuevos desarrollos de dispositivos médicos basados en el empleo de reactivos cromóforos y aplicar la metodología propuesta, para detectar inconvenientes o limitaciones e incorporar posibles mejoras.

Entre los dispositivos que se pueden desarrollar como respuesta a necesidades médicas reales y que podrían aportar ventajas diagnósticas y terapéuticas frente a otros existentes, a la vez que ayudar a mejorar la metodología propuesta, se pueden mencionar:

- Dispositivos POC para el diagnóstico y antibiograma rápido en cuadros clínicos de meningitis bacteriana.
- Dispositivos POC para el diagnóstico y antibiograma rápido en cuadros clínicos de bacteriemia o sepsis.
- Dispositivos POC para el diagnóstico y antibiograma rápido de infecciones de líquidos estériles (ej. líquido sinovial).
- Dispositivos POC para el diagnóstico y antibiograma rápido de infecciones de transmisión sexual.
- Dispositivos POC para el diagnóstico y antibiograma rápido de infecciones respiratorias.
- Dispositivos POC para la rápida detección de mecanismos de resistencia de especial vigilancia (BLEE, carbapenemasas, resistencia a meticilina...) mediante reactivos colorimétricos.
- Dispositivos POC para la detección simultánea de distintos microorganismos (enfoque sindrómico) mediante reactivos colorimétricos.
- Dispositivos POC para la detección de marcadores de infección bacteriana (ej. procalcitonina) mediante reactivos colorimétricos.

Para dar mayor generalidad a la metodología propuesta sería también adecuado llevar a cabo nuevos desarrollos de dispositivos médicos basados en el empleo de otras familias de materiales y reactivos, según las pautas de dicha metodología. Esto ayudaría a incorporar consideraciones adicionales, siguiendo un proceso de mejora continua.

Puede obtenerse información adicional sobre cómo acometer estas futuras propuestas, mediante la consulta, tanto del documento de Tesis, como de los principales documentos científico fruto de la misma y que se detallan en el anexo 8.4.

6.- CONCLUSIONES:

Las aportaciones científicas más importantes de la presente Tesis Doctoral son consecuencia de las investigaciones realizadas para dar respuesta a los objetivos planteados o bien corresponden a descubrimientos realizados a lo largo del desarrollo. Dichas aportaciones se enumeran y explican brevemente a continuación.

1.- Se ha diseñado y validado una herramienta diagnóstica *Point of Care* para la detección de bacteriuria significativa y antibiograma rápido, a partir de muestras de orina directa de pacientes con sospecha de cistitis, en un lapso de tiempo, inferior a las 10 horas.

2.- Se ha diseñado y validado un protocolo de impregnación estándar que asegura la estabilidad y eficacia de los principales reactivos implicados en el proceso microbiológico del dispositivo POC-ITU.

3.- En relación con el antibiograma convencional, el dispositivo POC-ITU muestra un elevado grado de correlación para la mayoría de antibióticos ensayados, reduciendo de forma notable el tiempo de respuesta en comparación con las técnicas de referencia habitualmente utilizadas en los laboratorios de Microbiología.

4.- Se ha planteado una metodología para el desarrollo de dispositivos médicos basados en el empleo de reactivos cromóforos. En esencia, se trata de una adaptación de las metodologías sistemáticas y estructuradas, pero añadiendo importantes consideraciones para facilitar el proceso de desarrollo de dispositivos médicos que detecten infecciones en otras muestras biológicas.

7.- BIBLIOGRAFÍA:

Ajayi AB, Nwabuisi C, Aboyeji AP, et al. Asymptomatic bacteriuria in antenatal patients in Ilorin, Nigeria. *Oman Med J*. 2012;27:31–35.

Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and metaanalysis. *Lancet*. 2011;377:228–241.

Altobelli E, Mohan R, Mach KE, Sin MLY, Anikst V, Buscarini M et al. Integrated Biosensor Assay for Rapid Uropathogen Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing. *Eur Urol Focus*. 2017;3:293-9. DOI: 10.1016/j.euf.2015.12.010.

Andreu A, Planells I, Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinarios. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Estudio nacional multicéntrico. *Med Clin (Barc)*. 2008;130:481-6.

Apisarnthanarak A, Danchaivijitr S, Khawcharoenporn T, Limsrivilai L, Warachan B, Bailey TC, et al. Effectiveness of Education and an Antibiotic-Control Program in a Tertiary Care Hospital in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2006;42:768-75.

Archibald L.K., Reller B. *Clinical Microbiology in developing countries*. CDC Atlanta, 7,2001. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncided/eid/vol7no2/Archibald.htm>, Acceso:21-10-05.

Arienzo A, Cellitti V, Ferrante V, Losito F, Stalio O, Cristofano F et al. A pilot clinical trial on a new point-of-care test for the diagnosis and fast management of urinary tract infections in the Emergency Department. *Int J Clin Med Microbiol*. 2016;1:107. DOI: 10.15344/2456-4028/2016/107.

Arienzo A, Valentina Cellitti, Valeria Ferrante, Francesca Losito, Ottavia Stalio, Lorenza Murgia, Rossella Marina, Flavia Cristofano, Michela Orrù, Paolo Visca, Salvatore Di Somma, Lorena Silvestri, Vincenzo Ziparo, Giovanni Antonini. A new point-of-care test for the rapid detection of urinary tract infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03728-3>.

Arredondo-García JL, Figueroa-Damián R, Rosas A, et al. Comparison of short-term treatment regimen of ciprofloxacin versus long-term treatment regimens of trimethoprim/sulfamethoxazole or norfloxacin for uncomplicated lower urinary tract infections: a randomized, multicentre, open-label, prospective study. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:840.

Baerheim A. Empirical treatment of uncomplicated cystitis. *Scand J Prim health Care*. 2012;30(1):1-2.

- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1415-8.
- Bartels MD, Boye K, Rohde SM, Larsen AR, Torfs H, Bouchy P, et al. A common variant of staphylococcal cassette chromosome mec type IVa in isolates from Copenhagen, Denmark, is not detected by the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* assay. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1524-7.
- Barton AP. A rapid bioluminescent method for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonies. *J Antimicrob Chemother.* 1985;15:61-7.
- Bissonnette L, Bergeron MG. Diagnosing infections - current and anticipated technologies for point-of-care diagnostics and home-based testing. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1044-53.
- Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:349-55.
- Blom M, Lund Sørensen T, Espersen F, Frimodt-Møller N. Validation of FLEXICULT™ SSI-Urinary Kit For Use in the Primary Health Care Setting. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(6):430-5.
- Blommaert A, Marais C, Hens N, et al. Determinants of between-country differences in ambulatory antibiotic use and antibiotic resistance in Europe: A longitudinal observational study. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:535-547.
- Boerema JB, Willems FT. Fosfomycin trometamol in a single dose versus norfloxacin for seven days in the treatment of uncomplicated urinary infections in general practice. *Infection.* 1990;18 Suppl 2:S80-8.
- Boyle-Vavra S, Daum RS. Reliability of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) assay in detecting MRSA isolates with a variety of genotypes from the United States and Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4546-51.
- Broeren MA, Maas Y, Retera E, Arents NL. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:286-91.
- Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:467-92.
- Brown P, Levinson SC. *Politeness: some universals in language usage.* Cambridge: Cambridge University Press, 1987.
- Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, Wolfhagen MJ. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol.* 2004;42:7-11.

Bryce A, Hay AD, Isabel Lane IF, Thornton HV, Wootton M, Costelloe C (2016) Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 352:i939. <https://doi.org/10.1136/bmj.i939>.

Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321–4.

Burillo, A., Rodríguez-Sánchez, B., Ramiro, A., Cercenado, E., Rodríguez-Créixems, M., Bouza, E., 2014. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PLoS One* 9 (1), e86915. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086915>.

Butler CC, Francis NA, Thomas-Jones E, *et al.* Point-of-care urine culture for managing urinary tract infection in primary care: a randomised controlled trial of clinical and cost-effectiveness. *Br J Gen Pract.* 2018; 68 (669): e268–e278. doi: 10.3399/bjgp18X695285.

Calvo J, Cantón R, Fernández Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos. 2011. 38. Navarro F (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado E, Cantón R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2011.

Campbell AK, Hallett MB, Weeks I. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods Biochem Anal.* 1985;31:317–416.

Cantón R, Gómez G. Impacto económico de los métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica: precio de la prueba o impacto clínico global. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(10): 659-666.

Cantón R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31 Suppl. 4:3–11.

Carrara L, Navarro F, Turbau M, Seres M, Morán I, Quintana I, *et al.* Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotidebased multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* 2013;62:1673–9.

Chen JR, Lee SY, Yang BH, Lu JJ. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008;41:259–64.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition.* CLSI document M07–A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Coban AY, Bozdogan B, Cihan CC, Cetinkaya E, Bilgin K, Darka O, et al. Two new colorimetric methods for early detection of vancomycin and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:580–2.

Coban AY. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2191–3.

Cohen Stuart J, Dierikx C, al Naiemi N, Karczmarek A, Van Hoek AH, Vos P, et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:1377–81.

Commission's C by the USNI of H and the E, Researchs D for H. REPORT on the Joint. In: EU-US Workshop Challenges and Solutions in the Development of New Diagnostic Tests to Combat Antimicrobial Resistance. 2011.

Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, *et al*. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010; 340:c2096. doi: 10.1136/bmj.c2096.

Dalet F, Del Río G. Infecciones urinarias. 1ª Edición. Editorial Médica Panamericana; 1997.

Dalet F, Broseta E, De Cueto M, Santos M, de la Rosa M. La infección urinaria. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2002. 14.

De Jong Z, Pontonnier F, Plante P. Single-dose fosfomicin trometamol (Monuril) versus multiple-dose norfloxacin: results of a multicenter study in females with uncomplicated lower urinary tract infections. *Urol Int*. 1991;46:344-8.

De la Guerra Ochoa E, Del Sordo Carrancio D, Echávarri Otero J, Chacón Tanarro E, Díaz Lantada A, Lafont Morgado P (2012). The influence of textured surfaces on the lubrication of artificial joint prostheses. In: Biodevices 2012 - international conference on biomedical electronics and devices. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.

Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem*. 1999;71:2732–8.

Díaz-Lantada, A. Metodología para el desarrollo de dispositivos médicos basados en el empleo de polímeros activos como sensores y actuadores (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Madrid. 2009.

Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol*. 1994;32:1757–62.

Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:317–28.

Eili Y. Klein, Thomas P. Van Boeckel, Elena M. Martinez, Suraj Pant, Sumanth Gandra, Simon A. Levin, Herman Goossens, Ramanan Laxminarayan. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Apr 10;115(15).

El Bashir H, Laundry M, Booy R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. *Arch Dis Child.* 2003;88:615–20.

Ferraro MJ. Should we reevaluate antibiotic breakpoints? *Clin Infect Dis.* 2001;33:S240–4.

Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz Bellido JL (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48 (6), 2110–2115. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02215-09>.

Ferreira L, Sánchez Juanes F, Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM (2011). Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. Extraction method. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1007–1012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.14690691.2010.03339.x>.

Finucane TE. 'Urinary tract infection' and the microbiome. *Am J Med.* 2017;130(3): e97–e98. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.08.018.

Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2010;7:653–660.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: Incidence, morbidity, and economic costs. *Am J. Med.* 2002;113(Suppl 1A):5S–13S.

Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2014;28 (1), 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>.

Frimodt-Moller N. Correlation between pharmacokinetic, pharmacodynamic parameters and efficacy for antibiotics in the treatment of urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;19:546-553.

Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1466–70.

García Rodríguez JA, Cantón R, García Sánchez JE, Gómez Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2000. 11. Procedimientos en Microbiología Clínica. Picazo JJ (editor). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2000.

García-Sánchez J., Gómez-Lus Centelles M., Rodríguez López F., Torreblanca Gil A. Recogida, transporte y conservación de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica. 1993. 1.

Garnacho-Montero J, Ortiz Leyba C, Herrera Melero I, Aldabó- Pallás T, Cayuela-Domínguez A, Márquez-Vacaro JA, et al. Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU by sepsis: a matched cohort study. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:436-41.

Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, Welsch J, Holden J, Ho SY, et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3236–43.

Getachew K, Tamirat A, Adane M. A retrospective study on prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacterial isolates from urinary tract infections in Tikur Anbessa Specialized Teaching Hospital Addis Ababa, Ethiopia, 2011. *Ethiop. J. Health Dev.* 2013;27(2).

Gharbi M., Drysdale J.H., Lishman H., Goudie R., Molokhia M., Johnson A., Holmes A., Aylin P. Antibiotic management of urinary tract infection in elderly patients in primary care and its association with bloodstream infections and all cause mortality: population based cohort study. *BMJ.* 2019;364:l525 <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.l525>.

Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, et al. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72:20–31.

Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* 2010;71:149–84.

Gimeno Cardona C, Gómez E, Leiva J, Navarro D, Pérez Sáenz JL. Evaluación económica de las pruebas diagnósticas en Microbiología Clínica. 2018. 64. Navarro D (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2018.

González M., Calmaggi A. Estrategias educativas para optimizar la prescripción y dispensación de antimicrobianos por los profesionales de la salud. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA), Forum Argentina, 2001. Disponible en: <http://www.tufts.edu/med/apua/chapters/ArgForum/ArgForum4.html>, Acceso:03-08-05.

Grabe M, Bartoletti R, Bjerklund Johansen TE, Cai T, Çek M, Köves B, Naber KG, Pickard RS, Tenke P, Wagenlehner F, Wullt B (2015). Guidelines on urological infections. European Association of Urology.

Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2918–31.

Guardabassi et al. Optimization and evaluation of Flexicult® Vet for detection, identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial uropathogens in small animal veterinary practice. *Acta Vet Scand.* 2015;57:72.

Gupta K, Sahm DF, Mayfield D, Stamm WE. Antimicrobial resistance among uropathogens that cause community-acquired urinary tract infections in women: a nationwide analysis. *Clin Infect Dis.* 2001;33(1):89–94. <https://doi.org/10.1086/320880>.

Gupta K, Scholes D, Stamm WE. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *JAMA.* 1999; 281:736-739.

Hecker MT, Aron DC, Patel NP, Lehmann MK, Donskey CJ. Unnecessary use of antimicrobials in hospitalized patients: current patterns of misuse with an emphasis on the antianaerobic spectrum of activity. *Arch Intern Med.* 2003;163:972-8.

Heffner AC, Horton JM, Marchick MR, Jones AE. Etiology of illness in patients with severe sepsis admitted to the hospital from the emergency department. *Clin Infect Dis.* 2010;50:814-20.

Holm A, Cordoba G, Sorensen TM, Jessen LR, Siersma V, Bjerrum L. Point of care susceptibility testing in primary care - does it lead to a more appropriate prescription of antibiotics in patients with uncomplicated urinary tract infection? Protocol for a randomized controlled trial. *BMC Fam Pract.* 2015;16:106.

Hooton TM, Besser R, Foxman B, Fritsche TR, Nicolle LE. Acute uncomplicated cystitis in an era of increasing antibiotic resistance: a proposed approach to empirical therapy. *Clin Infect Dis.* 2004;39:75-80.

Hooton TM, Latham RH, Wong ES, Johnson C, Roberts PL, Stamm WE. Ofloxacin versus trimethoprim-sulfamethoxazole for treatment of acute cystitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1308-12.

Hooton TM, Scholes D, Gupta K, Stapleton AE, Roberts PL, Stamm WE. Amoxicillin-clavulanate vs. ciprofloxacin for the treatment of uncomplicated cystitis in women: a randomized trial. *JAMA.* 2005;293:949-55.

Hooton TM, Stamm WE. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11:551-581.

Hooton TM, Winter C, Tiu F, Stamm WE. Randomized comparative trial and cost analysis of 3-day antimicrobial regimens for treatment of acute cystitis in women. *JAMA*. 1995;273:41-5.

Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011;49:3222–7.

Hulscher MEJL, Grol RPTM, van der Meer JWM. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:167-75.

Huppert J, Hesse E, Gaydos CA. What's the point? How point of care ITS test can impact infected patients. *Point Care: The journal of Near-Patient Testing & Technology*. 2010;9(1):36-46.

Ilki A, Bekdemir P, Ulger N, Soyletir G. Rapid reporting of urine culture results: impact of the uro-quick screening system. *New Microbiol*. 2010;33:147–53.

Institut de veille sanitaire (InVS) et Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) (2015) Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: Nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Bilan des Données de Surveillance. [Antibiotic consumption and antibiotic resistance in France: The need for a determined and sustainable mobilization. Review of Surveillance Data] (Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France), pp 1-16. French.

Íñigo M., Coello A., Fernández-Rivas G., Rivaya B., Hidalgo J., Quesada M.D., Ausina V., 2016. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 54 (4), 988–993. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02832-15>.

Isabel P. Alves, Nuno M. Reis. Microfluidic smartphone quantitation of *Escherichia coli* in synthetic urine. *Biosensors and Bioelectronics*. Volume 145, 1 December 2019, 111624. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111624>.

Ivancic V, Mastali M, Percy N, Gornbein J, Babbitt JT, Li Y, et al. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1213–9.

Jardin A. A general practitioner multicenter study: fosfomicin trometamol single dose versus pipemidic acid multiple dose. *Infection*. 1990;18 Suppl 2: S89-93.

Jimenez R. Indicadores de calidad y eficiencia de los servicios hospitalarios. Una mirada actual. *Rev Cubana Salud Pública*, 30, 2004. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/spu/indice.html>, Acceso: 03-08- 05.

Johanna Haiko, Laura E. Savolainen, Risto Hilla, Anu Pätäri Sampo. Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods* 129 (2016) 81–84.

Jonsson M, Englund G, Norgard K. Norfloxacin vs. pivmecillinam in the treatment of uncomplicated lower urinary tract infections in hospitalized elderly patients. *Scand J Infect Dis.* 1990;22:339-44.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1749–55.

Junquera S, Loza E, Baquero F. Changes in the antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from nosocomial versus community-acquired urinary tract infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:197-201.

Kahlmeter G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS project. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:69-76.

Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:428–35.

Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterization of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004;4:221–42.

Killgore KM, March KL, Guglielmo BJ. Risk factors community acquired ciprofloxacin resistant *E. coli* urinary tract infection. *Ann Pharmacother.* 2004;38:1148-52.

Kim Y, Park K.G, Lee K, Park Y.J. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the Vitek MS system based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann. Lab. Med.* 2015;35 (4), 416–422. <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2015.35.4.416>.

Klebens, R.M., Edwards, J.R., Richards Jr., C.L., Horan, T.C., Gaynes, R.P., Pollock, D.A., Cardo, D.M., 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep.* 122 (2), 160–166.

Köhling, H.L., Bittner, A., Müller, K.D., Buer, J., Becker, M., Rübber, H., Rettenmeier, A.W., Mosel, F., 2012. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J. Med. Microbiol.* 61, 339–344. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.032284-0>.

Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, Hiramatsu K. Use of a sensitive chemiluminescence-based assay to evaluate the metabolic suppression activity of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* showing reduced susceptibility to vancomycin. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19:734–42.

Koneman E., Allen S., Dowell V., Jand W., Sammers H., Win W. (h). Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Capítulo 12. En: *Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas a color*, 3ª ed. Ed. Panamericana, 1992.

Kothari A, Morgan M, Haake DA. Emerging technologies for rapid identification of bloodstream pathogens. *Clin Infect Dis*. 2014;59:272–8.

Kouri T, Fogazzi G, Gant V, Hallander H, Hofmann W, Guder WG, eds. European Urinalysis Guidelines. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000;60 (Suppl 231):1–96.

Kuklick, T.R. “The medical device R&D handbook”. CRC Press, Taylor and Francis Group. Florida, 2006.

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34:1589–96.

Kunin CM, White LV, Hua TH. A reassessment of the importance of “low-count” bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann Intern Med*. 1993;119:454–60.

Lagacé-Wiens PR, Nichol KA, Nicolle LE, DeCorby M, McCracken M, Mulvey MR, Zhanel GG. Treatment of lower urinary tract infection caused by multidrug-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* with amoxicillin/clavulanate: case report and characterization of the isolate. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:1262–3.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159-174. DOI: 10.2307/2529310.

Laxminarayan R, et al. Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. *Lancet*. 2016;387:168–175.

Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld KP, Goglio A, Kost GJ, Louie RF, et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med*. 2009;37:3085–90.

Lenton TM, et al. Tipping elements in the Earth’s climate system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:1786–1793.

Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. A resazurin reduction based assay for rapid detection of polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2019;57:e01563-18.

Levy, M.M., Artigas, A., Phillips, G.S., Rhodes, A., Beale, R., Osborn, T., Vincent, J.-L., Townsend, S., Lemeshow, S., Dellinger, R.P., 2012. Outcomes of the surviving sepsis campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis*. 12, 919–924. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70239-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70239-6).

Leylabadlo HE, Poulak T, Aghazadeh M, Asgharzadeh M, Kafil HS. Extended-spectrum beta-lactamase producing gram negative bacteria in Iran. *Afr J Infect Dis*. 2017; 11:39–53.

- Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: new aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol*. 2014;4:1–25.
- Lim C, et al. Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. *Elife*. 2016;5:e18082.
- Lim VH, Whitehurst T, Usoro E, Ming Ng S. Management of urinary tract infections in elderly patients: Strategies for improvement. *BMJ Qual Improv Rep*. 2014;3:u203314.w1503. doi:10.1136/bmjquality.u203314.w1503.
- Limb DI, Wheat PF, Spencer RC, Harris GS, Rayner AB, Watt B. Comparison of techniques for antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *J Clin Pathol*. 1993;46:403–7.
- Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4705–7.
- Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A (2015) Incidence and diversity of antimicrobial multidrug resistance profiles of uropathogenic bacteria. *BioMed Res Int*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/354084>.
- Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC Infect Dis*. 2013;13:19. doi:10.1186/1471-2334-13-19.
- Livermore DM, Pearson A. Antibiotic resistance: location, location, location. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(suppl 2):7-16.
- Llor C, Hernández S. Enfermedad infecciosa en atención primaria: estudio prospectivo efectuado durante todo un año. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:222-6.
- Lorente Garin JA, Placer Santos J, Salvado Costa M, Segura Álvarez C, Gelabert-Mas A. Evolución de la resistencia antibiótica en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. *Rev Clin Esp*. 2005;205:259-64.
- Lucy Brookes-Howell, PhD, Emma Thomas-Jones, PhD, Janine Bates et al. Challenges in managing urinary tract infection and the potential of a point-of-care test guided care in primary care: an international qualitative study. *BJGP Open*. 2019 Jul 23;3(2).
- Lueangarun S, Leelarasamee A. Impact of inappropriate empiric antimicrobial therapy on mortality of septic patients with bacteremia: a retrospective study. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012;2012:765205.
- Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Capria AL, Nibbering PH. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:89–95.

- Lutters M, Vogt-Ferrier NB. Antibiotic duration for treating uncomplicated, symptomatic lower urinary tract infections in elderly women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(3):CD001535. doi:10.1002/14651858.CD001535.pub2.
- MacDougall C, Polk RE. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:638-56.
- Mach KE, Mohan R, Baron EJ, Shih MC, Gau V, Wong PK, et al. A biosensor platform for rapid antimicrobial susceptibility testing directly from clinical samples. *J Urol*. 2011;185:148–53.
- Maki DG, Tambyah PA. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):342–347.
- Manome I, Ikedo M, Saito Y, Ishii KK, Kaku M. Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol*. 2003;41:279–84.
- March-Roselló GA, Bratos MA. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:61–8.
- March-Roselló GA, García-Loygorri MC, Gutiérrez MP, Simarro M, Orduña A, Bratos MA. A two-hour antibiotic susceptibility test by ATP-bioluminescence. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34:334–9.
- Martinez OV, Gratzner HG, Malinin TI, Ingram M. The effect of some betalactam antibiotics on *Escherichia coli* studied by flow cytometry. *Cytometry*. 1982;3:129–33.
- Mazulli T. Resistance trends in urinary tract pathogens and impact on management. *J Urol*. 2002; 168(4 Pt2): 1720–1722.
- McMurdo ME, Gillespie ND. Urinary tract infection in old age: over-diagnosed and over-treated. *Age Ageing*. 2000;29:297-8. doi:10.1093/ageing/29.4.297.
- Mendez-Alvarez S, Perez-Roth E. [Multiplex PCR in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:183–91, quiz 92.
- Millar LK, Cox SM. Urinary tract infections complicating pregnancy. *Infect Dis Clin North Am*. 1997;11:13-26.
- Miller LG, Tang AW. Treatment of uncomplicated urinary tract infections in an era of increasing antimicrobial resistance. *Mayo Clin Proc*. 2004;79:1048-53.
- Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:611–33.
- Mulholland SG. Urinary tract infection: *Clin Geriatr Med*. 1990;6:43-53.

Muñoz-Guijosa, J.M.; Bautista Paz, E.; Lafont Morgado, P.; Muñoz Sanz, J.L.; Muñoz García, J.; Echavarrí Otero, J.; Lorenzo Yustos, H.; Díaz Lantada, A. “Proyecto de Máquinas: Apuntes de Clase”. Sección de Publicaciones de la E.T.S.I. Industriales – Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, 2005.

Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1608–13.

Nagasawa Z, Manome I, Nagayama A. A rapid antimicrobial susceptibility test based on chemiluminescence assay and its application to screening of genotypes in vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Chemother.* 2004;10:220–6.

Navarro F., Miró E., Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(9):638-645.

Nicolle L. Urinary tract infection: traditional pharmacologic therapies. *Am J Med.* 2002;113:35S-44S.

Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, et al. IDSA guideline for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis.* 2005;40:643–654.

O’Neill J. Rapid diagnostics: stopping unnecessary use of antibiotics. Review on antimicrobial resistance. London: Wellcome Trust and HM Government, 2015.

Orenstein R, Wong ES. Urinary tract infections in adults. *Am Fam Phy.* 1999; 59:1225-1237.

Pahl, G., Beitz, W. “Engineering design: A systematic approach”. 2ª Edición Revisada. Springer Verlag. London, 1996.

Palou J, Pigrau C, Molina I, Ledesma JM, Angulo J, Grupo colaborador español del estudio ARESC. Etiología y sensibilidad de los uropatógenos identificados en infecciones urinarias bajas no complicadas de la mujer (estudio ARESC): implicaciones en la terapia empírica. *Med Clin (Barc).* 2011;136:1-7.

Pammolli, Fabio, Riccaboni, Massimo, Oglialoro, Claudia, Magazzini, Laura, Baio, Gianluca and Salerno, Nicola, (2005), Medical Devices Competitiveness and Impact on Public Health Expenditure, MPRA Paper, University Library of Munich, Germany, <https://EconPapers.repec.org/RePEc:pra:mprapa:16021>.

Paño-Pardo JR, Padilla B, Romero-Gómez M, Moreno-Romero F, Rico-Nieto A, Mora-Rillo M, et al. Actividades de monitorización y mejora del uso de antibióticos en hospitales españoles: resultado de una encuesta nacional. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:19-25.

Parks DR, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting: Theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods Enzymol.* 1984;108:197–241.

Parta M, Goebel M, Matloobi M, Stager C, Musher DM. Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in blood cultures and wound swabs by GeneXpert. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1609–10.

Patton JP, Nash DB, Abrutyn E. Urinary tract infection: economic considerations. *Med Clin North Am* 1991; 75: 495–513.

Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:1247–54.

Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, et al. Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *J Infect.* 2014;69:216–25.

Peter H, Berggrav K, Thomas P, Pfeifer Y, Witte W, Templeton K, et al. Direct detection and genotyping of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3990–8.

Petersen EE, Wingen F, Fairchild KL, Halfhide A, Hendrischk A, Links M, et al. Single dose pefloxacin compared with multiple dose co-trimoxazole in cystitis. *J Antimicrob Chemother.* 1990;26 Suppl B:147-52.

Picard FJ, Bergeron MG. Rapid molecular theranostics in infectious diseases. *Drug Discov Today.* 2002;7:1092–101.

Pigrau C, Horcajada JP, Cartón JA, Pujol M, Mensa J. Infección urinaria. *Protocolos Clínicos SEIMC 2002.* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/clinicos>.

Portnoy A, Jit M, Lauer J, Blommaert A, Ozawa S, Stack M, et al. Estimating cost of care for meningitis infections in low- and middle-income countries. *Vaccine.* 2015;33 suppl.1:A240–7.

Poutanen SM, Tompkins LS. Molecular Methods in Nosocomial Epidemiology. In: *Prevention and Control of Nosocomial Infections, 4th Ed.,* Wenzel RP, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003:481-499.

Powers JH. Risk perception and inappropriate antimicrobial use: yes, it can hurt. *Clin Infect Dis.* 2009;48:1350-3.

Prats G. Técnicas genéticas. En: Prats G, editor. *Microbiología Clínica.* 1ª ed Madrid: Médica Panamericana; 2005. p. 187–202.

Pulido MR, Garcia-Quintanilla M, Martin-Pena R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2710–7.

Quesada MD, Gimenez M, Molinos S, Fernandez G, Sanchez MD, Ravelo R, et al. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:137–40.

Ramani R, Chaturvedi V. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2752–8.

Ramani S. Promoting the art of history taking. *Med Teach*. 2004;26:374–376.

Ramos B.N. Calidad de la atención en salud. Capítulo 2. En: Control de la calidad de la atención en salud. Ed. Ciencias Médicas, La Habana, 2004.

Rello J, Lisboa T, Lujan M, Gallego M, Kee C, Kay I, et al. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest*. 2009;136:832–40.

Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: Versalovic J, editor. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 1082–114.

Rodríguez Domínguez M, Franco Álvarez de Luna F, Goyanes Galán MJ, García Rodríguez J. Diagnóstico microbiológico en el lugar de asistencia al paciente. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2019; 66.

Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am J Med*. 2002;113 (Supl 1A):14S-19S.

Roozenburg, N.; Eeckels J. “Product design: Fundamentals and methods”. John Wiley & Sons. New York, 1995.

Rosenberg M. Pharmacoeconomics of treating uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;11:247– 51.

Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Antibiotic susceptibility tests directly on urine samples using Uro-Quick, a rapid automated system. *J Chemother*. 2006;18:12–9.

Roveta S, Marchese A, Debbia EA. Evaluation of the Uro-Quick, a new rapid automated system, for the detection of well-characterized antibiotic-resistant bacteria. *J Chemother*. 2004;16:107–18.

Sabuncu E, et al. (2009) Significant reduction of antibiotic use in the community after a nationwide campaign in France, 2002-2007. *PLoS Med* 6:e1000084.

Samra Z, Rosenberg S, Madar-Shapiro L. Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:17–21.

Sandberg T, Englund G, Lincoln K, Nilsson LG. Randomised double-blind study of norfloxacin and cefadroxil in the treatment of acute pyelonephritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9:317-23.

Sandberg T., Skoog G., Hermansson A.B., Kahlmeter G., Kuylenstierna N., Lannergård A., Otto G., Settergren B., Ekman G.S. Ciprofloxacin for 7 days versus 14 days in women with acute pyelonephritis: a randomised, open-label and double-blind, placebo-controlled, non-inferiority trial. *Lancet.* 2012;380 (9840), 484–490. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60608-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60608-4).

Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 May;107(21):361-7.

Shekarchian S, Schwartz BS, Teherani A, Irby D, Chin-Hong PV. Is it time for a coordinated and longitudinal approach to antibiotic stewardship education? *Clin Infect Dis.* 2016;63:848–849.

Shiralizadeh, Somayeh & Taghizadeh, Sepehr & Asgharzadeh, Mohammad & Shokouhi, Behrooz & Gholizadeh, Pourya & Rahbar, Mohammad & Kafil, Hossein. Urinary tract infections: Raising problem in developing countries. *Reviews in Medical Microbiology.* 2018. 10.1097/MRM.0000000000000144.

Shrestha NK, Scalera NM, Wilson DA, Procop GW. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by flow cytometry after brief antibiotic exposure. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2116–20.

Sigurdsson JA, Ahlmen J, Berglund L, Jerneck M, Larsson L, Lincoln K, et al. Three-day treatment of acute lower urinary tract infections in women. A double-blind study with amoxicillin and co-trimazine. *Acta Med Scand.* 1983;213:55-60.

Siqueira J.E. El principio de la responsabilidad de Hans Jonas. En: Acosta Sario JR. Bioética para la sustentabilidad. Ed. Centro Félix Varela, La Habana, 2002.

Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: Winning back the urinary tract. *Infect Immun.* 2010;78:568–585.

Soraya S, Helio S, Ronald N, et al. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(7):741-748.

Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012;50:927–37.

Spencer DH, Sellenriek P, Burnham CA. Validation and implementation of the GeneXpert MRSA/SA blood culture assay in a pediatric setting. *Am J Clin Pathol.* 2011;136:690–4.

Stamm WE. Urinary tract infections and pyelonephritis. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. *Harrison's principles of internal medicine*, 13th ed. New York: McGraw-Hill, 1994: 548–54.

Stark RP, Maki DG. Bacteriuria in the catheterized patient. What quantitative level of bacteriuria is relevant? *N Engl J Med*. 1984;311(9):560–564.

Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, Mustafa S. Applications of flow cytometry on bacteria: Cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry*. 1982;2:249–57.

Stratton CW IV, Greene JN. Role of the Microbiology Laboratory in Hospital Epidemiology and Infection Control. In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*, 3rd Ed., Mayhall CG, editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2004:1809-1825.

Suárez CJ, Lolans K, Villegas MV, Quinn JP. Mechanisms of resistance to beta-lactams in some common Gram-negative bacteria causing nosocomial infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005;3:915–922.

Sundqvist, M., Olafsson, J., Matuschek, E., 2015. EUCAST breakpoints can be used to interpret direct susceptibility testing of Enterobacteriaceae from urine samples. *APMIS* 123 (2), 152–155. <http://dx.doi.org/10.1111/apm.12331>.

Tandogdu Z and Wagenlehner FM. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29:73–79.

Tang Y, Zhen L, Liu J, Wu J. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal Chem*. 2013;85:2787–94.

Toosky MN, Grunwald JT, Pala D, Shen B, Zhao W, D'Agostini C et al. A rapid, point-of-care antibiotic susceptibility test for urinary tract infections. *J Med Microbiol*. 2020; 69:52-62.

Tunkel AR. Meningitis. [consultado 28 Feb 2016]. Disponible en: www.antimicrobe.org/e7.asp

Tunney MM, Ramage G, Field TR, Moriarty TF, Storey DG. Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 May;48(5):1879-81.

U.S. Food and Drug Administration. Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA. Rockville: U.S. Food and Drug Administration; 2007.

Ulrich, K., Eppinger, S. “Product design and development”. 4th Edition. Mc-Graw Hill / Irwin. New York, 2007.

Van Belkum A, Dunne W. Pathogens: wanted-dead or alive. *Microbe Mag*. 2015;10:513–20.

Van Belkum A, Dunne WM Jr. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2018–24.

Veron, L., Mailler, S., Girard, V., Muller, B.H., L'Hostis, G., Ducruix, C., Lesenne, A., Richez, A., Rostaing, H., Lanet, V., Ghirardi, S., van Belkum, A., Mallard, F., 2015. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (9), 1787–1795. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-015-2413-y>.

Vila J, Gómez MD, Salavert M, et al. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(1):41–46.

Wagenlehner FM, Naber KG. Treatment of bacterial urinary tract infections: presence and future. *Eur Urol.* 2006;49(2):235-44.

Wagenlehner FME, Pilatz A, Weidner W, Naber KG (2015) Urosepsis: overview of the diagnostic and treatment challenges. *Microbiol Spectr* 3(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0003-2012>.

Waldbaur A, Rapp H, Länge K, Rapp BE. Let there be chip - towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes. *Anal Methods.* 2011;3(12):2681–2716.

Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Infectious Diseases Society of America (IDSA). Clin Infect Dis.* 1999;29:745-58.

Wheat PF, Hastings JG, Spencer RC. Rapid antibiotic susceptibility tests on Enterobacteriaceae by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 1988;25:95–9.

Wheat PF, Spencer RC, Hastings JG. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram-positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* 1989;29:277–82.

Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, Land GA, Davis JR, Musser JM, et al. Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2452–4.

Wolff M. Use and Misuse of antibiotics in Latin America. *Clin Infec Dis, (Suppl 2),* S346,1993.

Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *J Clin Microbiol.* 2009;47:823–6.

Yamashoji S, Ikeda T, Yamashoji K. Chemiluminescent assay for determination of viable cell density of yeast, mammalian, and plant cells. *Anal Biochem.* 1989;181:149–52.

Yolbas I, Tekin R, Kelekci S, Tekin A, Okur M, Ece A, et al. Community-acquired urinary tract infections in children: pathogens, antibiotic susceptibility and seasonal changes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:971–976.

Zboromyrska Y, Vergara A, Cosgaya C, Verger G, Mosqueda N, Almela M, et al. Rapid detection of β -lactamases directly from positive blood cultures using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assay. *Inter J Antimicrob Agents.* 2015;46:355–6.

8.- ANEXO:

8.1.- LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Distribución geográfica de la prevalencia de resistencia a ampicilina (%) de *E.coli* uropatógeno en países desarrollados (OECD) y subdesarrollados (Non-OECD). Número de estudios incluidos por país entre paréntesis.
- Figura 2.- Diseño virtual y prototipo del elemento Receptor del dispositivo POC para la detección de ITU y antibiograma rápido de Diagnochip[®].
- Figura 3.- Máscaras para la fabricación de un microsistema biomédico para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Máscara positiva y negativa para el uso de diferentes fotorresistencias (imágenes de la izquierda) y máscaras para dos pasos de micro-mecanizado dirigidas a la obtención de los pocillos exteriores con una profundidad adicional (imágenes de la derecha).
- Figura 4.- Patrones metálicos fabricados mediante fotolitografía UV y grabado químico.
- Figura 5.- Patrones metálicos fabricados por fotolitografía UV y ataque químico, que se pueden utilizar ya sea como partes finales o como moldes para la producción en masa de un microsistema biomédico a través del estampado en caliente o microinyección. Detalle: El uso de un proceso de dos pasos con diferentes máscaras permite la micro-fabricación de texturas con diferentes profundidades.
- Figura 6.- Prototipos rápidos del dispositivo POC con canales internos capaces de conducir la muestra por capilaridad.
- Figura 7.- Dispositivos de diseño monolítico sobre la plataforma de construcción.
- Figura 8.- PDMS y moldes de epoxi para obtener series más grandes del dispositivo utilizando un diseño alternativo basado en dos capas.
- Figura 9.- Tapa del Modelo 0 (vista superior).
- Figura 10.- Tapa del Modelo 0 (vista inferior).
- Figura 11.- Base del Modelo 0.
- Figura 12.- Conjunto ensamblado del Modelo 0.
- Figura 13.- Tapa del Modelo 1 (vista superior).

- Figura 14.- Tapa del Modelo 1 (vista inferior).
- Figura 15.- Base del Modelo 1.
- Figura 16.- Conjunto ensamblado del Modelo 1.
- Figura 17.- Tapa Modelo 2 (vista inferior).
- Figura 18.- Base del Modelo 2.
- Figura 19.- Conjunto de piezas que constituyen el Modelo 3 del dispositivo POC.
- Figura 20.- Tapa del elemento Receptor.
- Figura 21.- Arandela del elemento Receptor.
- Figura 22.- Base del elemento Receptor.
- Figura 23.- Cara superior de la pieza superior del dispensador por canales.
- Figura 24.- Cara inferior de la pieza superior del dispensador por canales.
- Figura 25.- Cara superior de la pieza inferior del dispensador por canales.
- Figura 26.- Cara inferior de la pieza inferior del dispensador por canales.
- Figura 27.- Elemento Dispensador por canales acoplado al elemento Receptor.
- Figura 28.- Pieza superior de la pipeta múltiple circular.
- Figura 29.- Pieza inferior de la pipeta múltiple circular.
- Figura 30.- Elemento dispensador tipo pipeta múltiple circular obtenido por el encaje cónico de las dos piezas.
- Figura 31.- Elemento Dispensador tipo pipeta múltiple circular acoplado al elemento Receptor.
- Figura 32.- Piezas que constituyen el elemento Receptor (Base, Arandela, Tapa) del prototipo inicial del dispositivo POC.
- Figura 33.- Prototipo del elemento Receptor del dispositivo POC tras montaje de todas las piezas.
- Figura 34.- Piezas del Dispensador de tipo canal.
- Figura 35.- Montaje del Dispensador de tipo canal.
- Figura 36.- Piezas del elemento Dispensador tipo pipeta múltiple circular.

- Figura 37.- Montaje del Dispensador tipo pipeta múltiple circular.
- Figura 38.- Conexión de la jeringa con el Dispensador del tipo pipeta múltiple circular.
- Figura 39.- Modelo de tarjeta de registro de resultados del dispositivo POC-ITU e instrucciones de uso.
- Figura 40.- Elemento Receptor finalmente propuesto como parte del dispositivo POC.
- Figura 41.- Tapa del elemento Receptor del dispositivo POC.
- Figura 42.- Elemento Receptor del dispositivo POC-ITU.
- Figura 43.- Pieza superior del Dispensador del dispositivo POC-ITU.
- Figura 44.- Pieza inferior del Dispensador del dispositivo POC-ITU.
- Figura 45.- Modelo del prototipo definitivo del dispositivo POC-ITU para la detección de ITU y antibiograma rápido.
- Figura 46.- Esquema de la siembra en TSA de las diluciones decimales de las cepas de referencia tras su incubación en agua de peptona.
- Figura 47.- Esquema del proceso de impregnación de los pocillos del dispositivo POC.
- Figura 48.- Receptor del dispositivo POC-ITU.
- Figura 49.- Paca ELISA estéril.
- Figura 50.- Placa ELISA con BHI-VT (columna 1-6) y MH-VT (columna 7-12) antes del proceso de desecación.
- Figura 51.- Procedimiento para la inoculación de diluciones seriadas de antibiótico en los pocillos de una placa ELISA.
- Figura 52.- Resultado de la textura final alcanzada en los pocillos tras el proceso de desecación.
- Figura 53.- Reacción de óxido-reducción del cloruro de tetrazolio.
- Figura 54.- Estructura química de la molécula violeta de tetrazolio.
- Figura 55.- Estructura química de la molécula resazurina.
- Figura 56.- Estructura química de la molécula 4-metilumbeliferil- β -D glucurónido.

- Figura 57.- Esquema de la placa ELISA impregnada con distintas diluciones de antimicrobiano (ej. amoxicilina/ác. clavulánico) frente a distintos inóculos bacterianos.
- Figura 58.- Esquema placa ELISA impregnada con distintas diluciones de antimicrobiano (ej. amoxicilina/ác. clavulánico) frente a distintos inóculos bacterianos representativos de orinas con distinto recuento.
- Figura 59.- Esquema placa ELISA para el ensayo de diferentes antibióticos frente a distintos inóculos representativos de orinas con distinto recuento.
- Figura 60.- Placa ELISA tras la desecación con BHI (izquierda) y Mueller-Hinton (derecha).
- Figura 61.- Dispositivo POC-ITU tras el proceso de impregnación.
- Figura 62.- Esquema placa ELISA para el ensayo de distintos antibióticos y definición del tiempo de lectura del dispositivo.
- Figura 63.- Algoritmo para la interpretación de resultados del dispositivo POC-ITU.
- Figura 64.- Mapa geográfico y localización del Hospital Mnazi Mmoja en la isla de Zanzíbar (Tanzania).
- Figura 65.- Presentación del dispositivo POC-ITU a los miembros del laboratorio de Microbiología del Hospital Mnazi Mmoja.
- Figura 66.- Recuento de aproximadamente 300 ufc/placa (300.000 ufc/ml \approx 5×10^4 ufc/150 μ l) tras una dilución 1/500 de la muestra de orina.
- Figura 67.- Recuento de aproximadamente 1000 ufc/placa ($>1.000.000$ ufc/ml \approx 150×10^3 ufc/150 μ l) tras una dilución 1/200 de la muestra de orina.
- Figura 68.- Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *E.coli* CECT 434.
- Figura 69.- Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *E.coli* CECT 434.
- Figura 70.- Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada in situ e inoculada con *E.coli* CECT 434.
- Figura 71.- Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada in situ e inoculada con *E.coli* CECT 434.

- Figura 72.- Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.
- Figura 73.- Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico previamente congelado e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.
- Figura 74.- Resultados de la visualización macroscópica de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada in situ e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.
- Figura 75.- Resultados de la visualización esquemática de la placa ELISA impregnada con amoxicilina/ác. clavulánico preparada in situ e inoculada con *K.oxytoca* CECT 8207.
- Figura 76.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 11-00 a las 7 horas de incubación.
- Figura 77.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 11-00 a las 10 y 12 horas de incubación.
- Figura 78.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 11-00 a las 22 horas de incubación.
- Figura 79.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 15-28 a las 7 horas de incubación.
- Figura 80.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 15-28 a las 10 - 12 horas de incubación.
- Figura 81.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 15-28 a las 22 horas de incubación.
- Figura 82.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 54-11 a las 7 horas de incubación.
- Figura 83.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 54-11 a las 10 - 12 horas de incubación.
- Figura 84.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 54-11 a las 22 horas de incubación.
- Figura 85.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-04 a las 7 horas de incubación.
- Figura 86.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-04 a las 10 - 12 horas de incubación.

- Figura 87.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-04 a las 22 horas de incubación.
- Figura 88.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-75 a las 7 horas de incubación.
- Figura 89.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-75 a las 10 - 12 horas de incubación.
- Figura 90.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 10-75 a las 22 horas de incubación.
- Figura 91.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 79-17 a las 7 horas de incubación.
- Figura 92.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 79-17 a las 10 - 12 horas de incubación.
- Figura 93.- Resultados del antibiograma de la cepa de *E.coli* 79-17 a las 22 horas de incubación.
- Figura 94.- Porcentaje de microorganismos Gram positivos y Gram negativos aislados en el estudio multicéntrico.
- Figura 95.- Porcentajes de resistencia de los aislados de *E.coli* y *Klebsiella spp.* AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ác. clavulánico; FOS: Fosfomicina; SXT: Cotrimoxazol; CIP: Ciprofloxacino.
- Figura 96.- Porcentaje global de resistencia de la serie de microorganismos incluidos en el ensayo multicéntrico, a los antibióticos objetivo del estudio. AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ác. clavulánico; FOS: Fosfomicina; SXT: Cotrimoxazol; CIP: Ciprofloxacino.
- Figura 97.- Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable bacteriuria significativa.
- Figura 98.- Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable contaminación de la orina.
- Figura 99.- Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable categoría Gram de la bacteria.
- Figura 100.- Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC-ITU y la prueba de referencia (urinocultivo) para la variable fermentación de la lactosa.

- Figura 101.- Resultados del dispositivo POC-ITU en los ensayos realizados a “pie de campo” con muestras clínicas de orina provenientes de pacientes con sospecha de ITU.

8.2.- LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.- Datos de eficacia clínica y microbiológica inicial de los distintos agentes recomendados para el tratamiento de la cistitis aguda no complicada.
- Tabla 2.- Distribución en placa ELISA de los distintos inóculos y su correspondiente dilución, para el cálculo del inóculo de trabajo del dispositivo POC-ITU.
- Tabla 3.- Relación de solventes y diluyentes recomendados para la preparación de las soluciones de trabajo de cada antibiótico.
- Tabla 4.- Perfil de sensibilidad de las distintas cepas de *E.coli* utilizadas en el ensayo para el cálculo de las concentraciones críticas de antibiótico.
- Tabla 5.- AMC: amoxicilina/ác. clavulánico; FOS: fosfomicina; CIP: ciprofloxacino; AMP: ampicilina; SXT: cotrimoxazol; Dp: disco-placa; CMI: concentración mínima inhibitoria.
- Tabla 6.- Distribución de los distintos reactivos del dispositivo POC-ITU.
- Tabla 7.- Recuento de microorganismos (ufc/placa) a las distintas diluciones de orina ensayadas.
- Tabla 8.- Descriptivos del método B para cada uno de los antibióticos estudiados.
- Tabla 9.- Perfil de sensibilidad a amoxicilina/ácido clavulánico de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.
- Tabla 10.- Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con amoxicilina/ácido clavulánico.
- Tabla 11.- Perfil de sensibilidad a fosfomicina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.
- Tabla 12.- Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con fosfomicina.
- Tabla 13.- Perfil de sensibilidad a ciprofloxacino de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.
- Tabla 14.- Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con ciprofloxacino.
- Tabla 15.- Perfil de sensibilidad a ampicilina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.

- Tabla 16.- Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con ampicilina.
- Tabla 17.- Perfil de sensibilidad a cotrimoxazol de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.
- Tabla 18.- Comparativa de los resultados obtenidos entre las distintas técnicas de referencia y el dispositivo, para el ensayo con cotrimoxazol.
- Tabla 19.- Perfil de sensibilidad a vancomicina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.
- Tabla 20.- Perfil de sensibilidad a colistina de distintas cepas de *E.coli* empleadas para los ensayos *in vitro* con este antibiótico.
- Tabla 21.- Intervalos de tiempo de lectura del dispositivo POC-ITU a los cuales se positivizan orinas con distinto inóculo bacteriano.
- Tabla 22.- Distribución de microorganismos por género y especie aislados durante el ensayo multicéntrico.
- Tabla 23.- Distribución de microorganismos aislados por centro hospitalario. HULP: Hospital Universitario La Paz; HULR: Hospital Universitario de La Ribera; PUHI: Hospital Universitario Puerta de Hierro.
- Tabla 24.- Porcentajes de sensibilidad y resistencia por centro hospitalario. HULP: Hospital Universitario La Paz; HULR: Hospital Universitario de La Ribera; PUHI: Hospital Universitario Puerta de Hierro.
- Tabla 25.- Porcentajes de sensibilidad, especificidad y sus respectivos IC 95% de las variables cualitativas evaluadas.
- Tabla 26.- Porcentajes de VPP, VPN y sus respectivos IC 95% de las variables cualitativas evaluadas.
- Tabla 27.- Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC y la prueba de referencia (urinocultivo). Un *P-valor* $\leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.
- Tabla 28.- Porcentaje de falsos positivos y falsos negativos de las distintas variables cualitativas evaluadas del dispositivo POC-ITU.
- Tabla 29.- Porcentajes de sensibilidad, especificidad y sus respectivos IC 95% de los antibióticos ensayados.
- Tabla 30.- Porcentajes de VPP, VPN y sus respectivos IC 95% de los antibióticos ensayados.

- Tabla 31.- Frecuencias observadas entre los diferentes datos extraídos del dispositivo POC y la prueba de referencia (urinocultivo) en relación al antibiograma. Un $P\text{-valor} \leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.
- Tabla 32.- Porcentajes de correlación y sus respectivos IC 95% de las distintas variables del dispositivo POC-ITU evaluadas.
- Tabla 33.- Estudio del manejo de las dos técnicas en los diferentes hospitales participantes en el estudio multicéntrico. Un $P\text{-valor} \leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.
- Tabla 34.- Estudio del manejo del antibiograma del dispositivo POC-ITU en los diferentes hospitales participantes en el estudio multicéntrico. Un $P\text{-valor} \leq 0,050$ se toma como estadísticamente significativo.

8.3.- LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ABS.- Acrilonitrilo butadieno estireno.
- ADB.- Área de Diagnóstico Biológico.
- AMC.- Amoxicilina/Ácido clavulánico.
- AMP.- Ampicilina.
- AST.- *Antimicrobial susceptibility testing*; Sistema de prueba de sensibilidad a antimicrobianos.
- ATB.- Antibiótico.
- ATP.- Adenosín trifosfato.
- BHI.- *Brain Heart Infusion*. Caldo de cerebro-corazón.
- BIMCA.- Boletín de Información Microbiológica y Consumo de Antibióticos.
- BLEE.- Beta-lactamasa de espectro extendido.
- CDC.- Centros para el Control y Prevención de Enfermedades.
- CE.- Conformidad Europea.
- CEE.- Comunidad Económica Europea.
- CIP.- Ciprofloxacino.
- CLSI.- *Clinical & Laboratory Standards Institute*.
- CMI.- Concentración Mínima Inhibitoria.
- DNA.- Ácido desoxirribonucleico.
- Dp.- Disco-placa.
- EFG.- Equivalente Farmacéutico Genérico.
- ELISA.- *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
- EUCAST.- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- FDA.- Administración Americana de Alimentos y Medicamentos.
- FOS.- Fosfomicina.
- HF.- Ácido fluorhídrico.
- HULP.- Hospital Universitario La Paz.
- HULR.- Hospital Universitario de La Ribera.
- HUPH.- Hospital Universitario Puerta de Hierro.
- IC.- Intervalo de confianza.
- IRAS.- Infecciones relacionadas con la atención sanitaria.
- ITS.- Infecciones de transmisión sexual.
- ITU.- Infección del tracto urinario.
- LCR.- Líquido cefalorraquídeo.
- LDP.- Laboratorio de Desarrollo de Producto.
- MH.- Mueller-Hinton Agar.
- MUG.- 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido.
- OMS.- Organización Mundial de la Salud.
- ONG.- Organización no gubernamental.
- PBS.- *Phosphate Buffered Saline*; Tampón fosfato salino.
- PCR.- *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa.
- PDMS.- Polidimetilsiloxano.
- PEEK.- Polieteretercetona.
- POC.- *Point of Care*.

- POC-ITU.- Dispositivo *Point of Care* para la detección de ITU y antibiograma rápido.
- PROA.- Programa de Optimización de Antibióticos.
- PVC.- Cloruro de Polivinilo.
- RLU.- Unidad de luz relativa.
- RNA.- Ácido ribonucleico.
- RZ.- Resazurina.
- SEIMC.- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- SNC.- Sistema Nervioso Central.
- SXT.- Cotrimoxazol.
- TAAN.- Técnica de amplificación de ácidos nucleicos.
- TATFAR.- Fuerza Transatlántica sobre la resistencia a los antimicrobianos.
- TSA.- *Tryptic Soy Agar*.
- UCI.- Unidad de Cuidados Intensivos.
- UFC.- Unidad formadora de colonia.
- UPM.- Universidad Politécnica de Madrid.
- UV.- Ultravioleta.
- VIH.- Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VPN.- Valor predictivo negativo.
- VPP.- Valor predictivo positivo.
- VRS.- Virus respiratorio sincitial.
- VT.- Violeta de Tetrazolio.

8.4.- PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

Se enumeran a continuación los principales documentos científicos relacionados con la Tesis Doctoral, como parte de la importante tarea de difusión de resultados y de intercambio de información con otros investigadores, de cara a fomentar los avances en este campo de estudio.

J.J. Gil-Tomas, J. Colomina-Rodríguez, M. Cuenca-Torres, J.L. Ruiz-López, S. Drogett, M. Soto. “Using a fluorogenic substrate in antibiotic susceptibility testing bacteria”. Eighth Mediterranean Emergency Medicine Congress. September 5 – 9, 2015 (Rome, Italy).

Jover-García J., Colomina-Rodríguez J., Díaz-Lantada A., Oliver-Sáez P., Soto M., Droguett S. “Fabricación y validación de un dispositivo *Point of Care* para la detección de infección urinaria y antibiograma rápido en países en vías de desarrollo”. III Congreso conjunto de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas (SEICV) y de la Sociedad Valenciana de Microbiología Clínica (SVAMC). 7 – 9 Febrero, 2019 (Castellón, España).

Jorge Jover García, Javier Colomina Rodríguez, Andrés Díaz Lantada, Pilar Lafont Morgado, Paloma Oliver Sáez, Elena López Camacho, Jesús Mingorance Cruz, María Muñoz Algarra, Mario Soto, Sara Doguett. “Desarrollo y validación de un dispositivo *Point of Care* para la detección de infección urinaria y antibiograma rápido en países en vías de desarrollo”. XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 23 – 25 Mayo, 2019 (Madrid, España).

Jorge Jover-García, Jesús J. Gil-Tomás, Andrés Díaz-Lantada, Pilar Lafont-Morgado, Paloma Oliver-Sáez, Javier Colomina-Rodríguez. Validación de un dispositivo *Point-of-Care* para la detección rápida de infección urinaria y susceptibilidad antibiótica. Rev Chilena Infectol. 2020.

8.5.- HOJA DE RECOGIDA DE DATOS (ESTUDIO MULTICÉNTRICO)

Número de Muestra: Número de paciente/dispositivo: Fecha:

Edad:..... Sexo:.....DIAGNOSTICO:

ANORMALES Y SEDIMENTO (0 = ausencia; 1+ = escasos; 2+: moderados; 3+: abundantes):

Leucocitos:Bacterias:Células epiteliales:TINCIÓN DE GRAM:

CALIDAD DE LA LECTURA (de 1 a 3): Tiempo de positividad (horas):

Identificación dispositivo POCT:

C	1	2	3
Crecimiento significativo POCT No (0) / Sí (1)	Lactosa POCT Neg (0) / Pos (1)	Colistina POCT S (0) / R (1)	Vancomicina POCT S (0) / R (1)

Deducibles de la identificación:

Crec. Significat. POCT No (0) / Sí (1)	Contaminación POCT No (0) / Sí (1)	Interpretación POCT Gram - (0) / Gram + (1)	Lactosa POCT Neg (0) / Pos (1)

Antibiograma dispositivo POCT:

4	5	6	7	8
Ampicilina POCT S (0) / R (1)	Amox/Clav POCT S (0) / R (1)	Fosfomicina POCT S (0) / R (1)	Cotrimoxazol POCT S (0) / R (1)	Ciprofloxacino POCT S (0) / R (1)

Urinocultivo convencional:

Identificación bacteriana:

Crec. Significat. Cultivo No (0) / Sí (1)	Contaminación Cultivo No (0) / Sí (1)	Interpretación Cultivo Gram - (0) / Gram + (1)	Lactosa Cultivo Neg (0) / Pos (1)

Antibiograma convencional:

Ampicilina antibiograma S (0) / R (1)	Amox/Clav antibiograma S (0) / R (1)	Fosfomicina antibiograma S (0) / R (1)	Cotrimoxazol antibiograma S (0) / R (1)	Ciprofloxacino antibiograma S (0) / R (1)	
					Interpretación (CMI)
					disco-placa (mm)

