

# Informe final publicable de proyecto

## Desarrollo de un test inmunocromatográfico rápido para la detección de uropatógenos y betalactamasas de espectro extendido en orina

Código de proyecto ANII: FMV\_3\_2018\_1\_148363

01/09/2021

**ROBINO PICON, María Luciana** (Responsable Técnico - Científico)

**GONZÁLEZ CANDIA, María José** (Investigador)

**MÓNACO PATIÑO, Amy Elizabeth** (Investigador)

**MORENO JAUGE, María** (Investigador)

**SCAVONE GUILLERMO, Paola** (Investigador)

**DA CUNDA SILVA Y MONTI, María Paula** (Investigador)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\  
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" \\  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA

## Resumen del proyecto

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) son un problema frecuente. *Escherichia coli* es el principal agente etiológico, seguido por *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*.

La técnica de oro para el diagnóstico de ITU es el urocultivo, pero su resultado demora al menos 48h. La tira reactiva de orina (TRO) se utiliza como test rápido de tamizaje para ITU. La desventaja es su baja sensibilidad (41-64% para nitritos y 48-86% para leucocitos) y especificidad variable (82-98%), lo cual conduce en muchos casos a diagnósticos incorrectos y al uso inapropiado de antimicrobianos.

El objetivo del estudio fue desarrollar un test inmunocromatográfico (TI) rápido para la detección de los uropatógenos más frecuentes en orina. A su vez, nos propusimos evaluar un formato comercial de TI para detectar *E. coli* en orina y evaluar su rendimiento en muestras clínicas de pacientes con sospecha de ITU.

Se evaluaron y seleccionaron diferentes anticuerpos comerciales para la detección de los distintos uropatógenos mediante ELISA. Se desarrollaron los TI de producción propia para cada uropatógeno y se puso a punto el test comercial con formato universal utilizando el par de Ac anti *E. coli* seleccionado previamente.

Para la validación del test se analizaron 161 muestras de orina de pacientes con sospecha de ITU y se comparó su resultado con el del urocultivo.

Si bien se consiguió desarrollar un prototipo de TI que funcionó para la detección de los patógenos evaluados, su interpretación presentó dificultades visuales, por lo cual se procedió a utilizar el TI comercial que presentó mejor especificidad, valor predictivo positivo y precisión diagnóstica que la TRO. La combinación de ambas técnicas (TRO más TI) como método de tamizaje presenta una excelente sensibilidad (94%) y precisión diagnóstica (80%), representando una buena y rápida estrategia alternativa para los urocultivos.

## Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Biotecnología relacionada con la Salud / Microbiología

**Palabras clave:** Test inmunocromatográfico / Infección urinaria / Test diagnóstico /

### Introducción

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) son un problema frecuente, afectando aproximadamente el 50% de todas las mujeres y el 12% de los hombres y niños (Koljalg 2009, Foxman 2003, O'Hanley, 1996). Un 20% de estas mujeres presentaran recurrencia en los siguientes 6 a 12 meses y el 30% tendrá más de un episodio de ITU (Foxman 2000). En niños la ITU puede estar asociada con anomalías morfológicas o funcionales del tracto urinario (Le Saux 2000). Los costos del tratamiento de las ITU son elevados, siendo de unos 3500 millones de dólares anuales solo para los Estados Unidos. En el año 2006 se reportaron más de 11 millones de consultas al sistema de salud, 1,7 millones en emergencias y casi medio millón de ingresos hospitalarios en dicho país (Litwin 2007; DeFrances 2006). En Uruguay no contamos con datos epidemiológicos de prevalencia y costos globales de las ITU.

El agente etiológico más frecuente, en todos los tipos de ITU, es *Escherichia coli* uropatógeno (UPEC) (Flores-Mireles 2015). Se detecta en más del 80% de los casos y su frecuencia es similar en distintos rangos etarios y zonas geográficas (Flores-Mireles 2015, Robino 2014a). Le siguen en frecuencia *Klebsiella pneumoniae* (6%), *Staphylococcus saprophyticus* (6%), *Proteus mirabilis* (4%), *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* del grupo B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida spp* (Seija 2010).

El diagnóstico de ITU surge de la presencia de síntomas y signos (dolor al orinar con aumento de la frecuencia de micción, incontinencia, fiebre, dolor abdominal y lumbar) y de la detección de bacterias en orina en cantidades significativas (Roberts 2011, Stamm 1980, Pezzlo 2014). La técnica considerada de oro para el diagnóstico de ITU es el urocultivo (Roberts 2011, Stamm 1980, Pezzlo 2014). La desventaja de ésta técnica es el tiempo que requiere, necesitando al menos 24h para el crecimiento de colonias y otras 24-36h para la identificación bacteriana y el estudio de susceptibilidad antibiótica (Pezzlo 2014, McCarter 2009). Mientras tanto el paciente recibe tratamiento antibiótico de forma empírica, sin confirmación de la presencia de infección. Un diagnóstico inicial incorrecto conduce al uso inapropiado de antimicrobianos.

La tira reactiva de orina (TRO) es el test de sospecha que se utiliza con mayor frecuencia en el lugar donde el paciente está siendo asistido ("point of care", POC), presentando la ventaja de no requerir equipamiento ni personal calificado para su realización. Para el diagnóstico de ITU los principales parámetros que detecta son los nitritos y las esterasas

leucocitarias (Waller 2018). No todas las bacterias son capaces de reducir los nitratos de la orina a nitritos, sólo pueden hacerlo aquellas del orden Enterobacteriales. Por lo tanto la prueba de nitritos no detecta la presencia de algunos uropatógenos frecuentes como *S. saprophyticus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* o *Candida* (Waller 2018). Las esterasas leucocitarias son un test indirecto de la presencia de piocitos en orina por lo que no define directamente la presencia de bacterias en orina, ya que se pueden detectar piocitos en otras situaciones como vulvovaginitis, uretritis, etc. Otra limitante es la interpretación de los resultados por parte de los médicos. La ausencia de esterasas leucocitarias y nitritos tiene un valor predictivo negativo cercano al 90%, pero la sensibilidad de los nitritos y esterasas leucocitarias es baja (48 % y 64% respectivamente), con una buena especificidad cercana al 93% en el caso de los nitritos, pero baja (73%) para las esterasas leucocitarias. La presencia de ambos parámetros mejora su sensibilidad y especificidad (80%) (Waller 2018). Otra de las desventajas de la TRO es que no detecta de manera directa la presencia de bacterias y no aporta datos en cuanto al microorganismo responsable de la infección.

En los últimos años nuevas tecnologías han sido desarrolladas para el diagnóstico de ITU como MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) presentando una sensibilidad de 79,2% y especificidad de 73,5% (Burillo 2014), citometría de flujo (Sysmex UF1000), PCR cuantitativa en tiempo real, y técnicas de espectroscopía (Davenport 2017). La necesidad de equipamientos costosos y personal calificado limitan la aplicabilidad de estos métodos diagnósticos en los laboratorios clínicos y para su uso como POC.

Los test inmunocromatográficos (TI) son una opción práctica para ser utilizados en el lugar donde el paciente es asistido, ya que son económicos y fáciles de utilizar e interpretar.

En relación a esto surge la necesidad de un test de diagnóstico de ITU con mejor precisión diagnóstica, rápido y de fácil utilización que los que se utilizan hoy en día.

En este trabajo nos propusimos desarrollar un TI rápido para la detección de *Escherichia coli* y otros uropatógenos de importancia (*Klebsiella* spp, *Proteus* y *Staphylococcus saprophyticus*) y evaluar su rendimiento en muestras de orina de pacientes con sospecha de ITU.

Como resultados esperamos obtener un TI que permita:

- Detectar bacterias directamente de la muestra de orina
- Identificar el agente etiológico (detectando el 98% de los microorganismos que se aíslan con mayor frecuencia) de forma rápida
- Seleccionar de manera adecuada el tratamiento antibiótico empírico al conocer el microorganismo causante
- Ser interpretado fácilmente (positivo/negativo)
- Ser realizado en el sitio donde se esté asistiendo al paciente ya sea hospital, policlínica o domicilio sin requerir de infraestructura ni de personal entrenado.

## **Metodología/diseño del estudio**

Para el desarrollo del TI para la detección de uropatógenos en orina el estudio se dividió en 3 etapas:

Selección de los Ac de captura y de detección para los distintos uropatógenos

Puesta a punto del protocolo del TI

Evaluación del test en muestras de orina de pacientes con sospecha de ITU.

### **1. Selección de Ac de captura y de detección**

Se realizó una búsqueda de distintos Ac dirigidos contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. saprophyticus* disponibles comercialmente, para ser utilizados como anticuerpos de captura. También se seleccionaron Ac de detección contra LPS (para detectar bacterias Gram negativas) y Ac anti ácido teicoico para Gram positivos.

Los Ac fueron evaluados mediante la técnica de ELISA utilizando el protocolo que se describe a continuación. Las placas de ELISA de 96 pocillos de alta afinidad fueron sensibilizadas con la suspensión en PBS de bacterias a detectar e incubadas a 4°C toda la noche. En un inicio como muestras se utilizaron cepas ATCC de *E. coli* y *S. aureus*, la cepa de *P. mirabilis* 2921 y la cepa E1 *K. pneumoniae* (provenientes de aislamientos clínicos) previamente crecidas en caldo Luria Bertani (LB). Luego de lavados con PBS-Tween, se procedió al bloqueo con leche descremada al 5% durante 1h a 37°C.

Luego de 3 lavados con PBS-Tween se añadió el Ac a evaluar (de captura o de detección) a 10 µg/mL en PBS-Tween leche y se incubó durante 1h a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween se añadió Ac anti IgG secundario a la especie en que fue producido el Ac evaluado, conjugado con peroxidasa y se dejó incubarlo durante 30 min a 37°C. Para el revelado se utilizó como sustrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) durante 15 min y se añadió el mismo volumen de HCl 1N para detener la reacción. Los resultados de densidad óptica (DO) se leyeron a 450 nm.

Luego de elegir los Ac con mejor capacidad de detección de los uropatógenos (mediante valores de DO) se procedió a evaluarlos frente a distintas cepas de nuestra colección provenientes de aislamientos clínicos y crecidas en orina artificial a distintas concentraciones, así como evaluar posibles reacciones cruzadas con otras especies.

Los criterios para la selección de los Ac a ser evaluados mediante el TI fueron aquellos que en el ensayo de ELISA presentaron una mayor DO y que permitieran detectar 10000 UFC/ml o más (ya que recuentos menores no suelen ser significativos para el diagnóstico de ITU), con menos reacciones cruzadas.

## 2. Desarrollo del TI

### 2.1 Desarrollo y puesta a punto del TI de producción propia

#### 2.1.a. Preparación del conjugado Ac de detección-nanopartículas de oro (AuNps)

La conjugación de los Ac de detección con AuNps se realizó mediante el kit comercial (Gold conjugation kit, 40nm, Abcam).

Se diluyó el Ac stock anti-LPS (Gram negativo) y anti-ácido lipoteicoico (Gram positivo) a una concentración de 0,1mg/ml en un volumen final de 12 µl y se mezcló con 42 µl de buffer de reacción. Esta mezcla se agregó a un vial con nanopartículas de oro, se homogeneizó vigorosamente y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Por último se agregó el quencher y de esta forma se obtuvo el conjugado AuNps – Ac de detección.

#### 2.1.b. Armado de la tira

Las tiras se prepararon utilizando papel Whatman, membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro (Bio-Rad) previamente tratada con Ac y bloqueo como se explica en la sección 2.1c y papel adhesivo. Se cortaron tiras de 0,5 x 4 cm de membrana para la sección de detección, la cual fue fijada sobre un papel adhesivo como se muestra en el esquema. Luego se cortan los trozos de papel Whatman para la sección de muestra los cuales se fijaron de la misma forma sobre el papel adhesivo pero superponiendo aproximadamente 1 cm del mismo sobre la membrana para crear un efecto sándwich entre ambos y favorecer el flujo de orina (muestra líquida) desde el papel y hacia la membrana generando así el flujo lateral.

#### 2.1.c. Tratamiento de la sección de detección previo al ensamblaje de la tira.

Sobre la sección de detección (membrana de nitrocelulosa) se definieron las áreas de test y control donde se aplicarían los Ac. Se prepararon diluciones de los Ac de captura contra los microorganismos a evaluar a 1 mg/ml y de IgG anti-ratón o cabra (dependiendo del Ac de detección que se fuera a utilizar, anti-ácido teicoico o LPS, respectivamente) a 0,5 mg/ml en PBS 50 mM pH 7.4. Se colocaron 2 µL del Ac de captura en la línea de test y 2 µL de Ac IgG anti-ratón o cabra en la línea de control. Se dejó secar la membrana en estufa a 37°C durante 1h con la zona de aplique de los Ac hacia arriba. Luego se incubó con solución de bloqueo PBS-Tween leche 5% durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavó dos veces con agua destilada. Finalmente se secó durante 20 min a 37°C en estufa, dejándola completar el secado ON a temperatura ambiente.

#### 2.1.d. Procedimiento de test

En placas de 96 pocillos se colocaron 150 µl de la suspensión bacteriana a detectar en diferentes concentraciones (se probaron diluciones de 1000 UFC/ml a 1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml) y se agregó 10 µl del conjugado AuNps-antiLPS ó anti ácido lipoteicoico (se probaron diluciones del AuNps-Ac desde 6 DO a 20 DO). Se incubó a temperatura ambiente 5 min para permitir que ocurra la reacción entre Ac y antígenos. En otro pocillo se colocó 150 µl de medio LB con 10 µl del conjugado AuNps-LPS o AuNps-ácido lipoteicoico como control negativo. Se colocó una tira en cada pocillo en el sentido correspondiente con la sección de muestra hacia abajo. Se incubó 10-20 min la tira en el pocillo para permitir el flujo de la

orina y luego observar los resultados.

Interpretación del resultado:

Positivo para dicho microorganismo: Aparición de marca de color en zona de test y zona de control

Negativo para dicho microorganismo: Aparición de marca de color en zona de control.

No se pueden validar los resultados si no hay aparición de color en la zona de control.

## 2.2 TI de flujo lateral comercial

Como alternativa al desarrollo de la tira reactiva casera, se utilizó y puso a punto un TI de flujo lateral comercial utilizando el kit "Universal Lateral Flow Assay Kit" (abcam 270537).

Esta tira universal utiliza la tecnología Ulfa-Tag, presentando a nivel de la línea de test Ac anti Ulfa-Tag, y en la línea de control estreptavidina. Los Ac de captura se conjugan con Ulfa-Tag y los de detección con AuNps. Como control del test se coloca una solución de biotina conjugada con AuNps la cual reaccionará con la estreptavidina. La figura 1 esquematiza el funcionamiento del TI comercial (ver en documento Anexo).

Para la preparación de la tira de flujo lateral empleando el kit comercial primero se conjugaron el Ac de captura y de detección usando el kit Lightning-Link® Ulfa-Tag y el kit Gold Conjugation (40 nm, 20 OD) respectivamente.

### 2.2.a. Conjugación del Ac de captura con kit Lightning-Link® Ulfa-Tag:

Antes de comenzar a trabajar con el mix Ulfa-Tag se agregó en un tubo 1 ?L de reactivo LL- Modifier cada 10 ?L de anticuerpo a preparar. Luego se agregó el anticuerpo al vial con el mix liofilizado de Ulfa-Tag y se resuspendió para homogeneizar. Se incubó la solución por 3 hs a temperatura ambiente (20-25°C). Luego de la incubación se agregó 1 ?l del LL-Quencher a la mezcla por cada 10 ?l de anticuerpo usado y se procedió a usar el conjugado no antes de 30 minutos de incubación.

### 2.2.b. Conjugación del anticuerpo de detección con nanopartículas de oro:

Se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente (2.1.a.)

Una vez preparados los conjugados, se probaron distintas concentraciones del Ac de captura (40 a 150 ?g/ml) y de Ac de detección-AuNps (6 DO a 20 DO).

### 2.2.c. Procedimiento del test:

Para una tira se preparó el mix de reacción mezclando 5 ?L de conjugado Ulfa-Tag-Ac de captura, 5 ?L de AuNps-Ac de detección 6 DO 40 nm, 5 ?L de conjugado Biotina-AuNps 1 DO 40 nm y 75 ?L de orina. Esta mezcla se incubó 5 minutos y luego se transfirió 80 ?l a un pocillo de una placa de 96 pocillos y se colocó una tira del TI Universal sin tocar la nitrocelulosa.

Se incubó 20-30 minutos y luego de dicho tiempo se procedió a la lectura de los resultados.

En la figura 2 se observa la forma de interpretar los resultados (ver en documento Adjunto).

## 3. Evaluación del test en muestras de orina de pacientes con sospecha de ITU

Criterios de inclusión de pacientes: se estudiaron muestras de orina de pacientes con sospecha clínica de ITU que fueron enviadas al laboratorio de microbiología del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR) para su estudio. Las muestras fueron seleccionadas al azar y se incluyeron tanto mujeres y hombres de todas las edades.

El urocultivo (técnica de oro) se realizó en el laboratorio de Microbiología del CHPR por personal independiente a los investigadores de éste estudio.

Una alícuota de las muestras de orina fue enviada, refrigerada, al Laboratorio de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. Allí se procedió a la realización del test mediante TRO convencional y el TI de flujo lateral. Los resultados del

urocultivo se conocieron luego de realizadas ambas tiras.

El test con la TRO se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (URIT 10V, URIT Medical Electronic Co, Guilin China). Se consideró positivo ante la presencia de 2 ++ o más de esterasas leucocitarias, y/o nitritos positivos ó 1+ de esterasas leucocitarias más la presencia de proteínas y/o sangre en la orina.

Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), precisión diagnóstica, razón de verosimilitud positiva y negativa, utilizando el programa OpenEpi 3.1

## **Resultados, análisis y discusión**

### **1. Selección de los Ac**

En la tabla 1 se observan los Ac estudiados y el promedio de los valores de DO, medida a 450 nm, de los distintos ensayos realizados con diferentes cepas para cada Ac (Ver tabla 1 en el anexo)

De acuerdo a dichos resultados los Ac seleccionados para ser utilizados en el TI de flujo lateral, como Ac de captura fueron: Anti E. coli, Thermo Fisher (PA1-73029); Anti Klebsiella pneumoniae UsBiological (K1891-20E); Anti Proteus (producción y donación por parte del Departamento de Microbiología del IIBCE), Anti Staphylococcus, Abcam (ab20920). Los Ac de detección seleccionados fueron: Ac anti Gram+, Abcam (ab20344) y Anti-LPS UsBiological (L2525).

### **2. Resultados de la puesta a punto del TI de producción propia:**

Se diseñaron y desarrollaron las tiras de flujo lateral de acuerdo al protocolo descrito previamente.

En todos los ensayos realizados se obtuvo excelente señal de color a nivel de la zona de control lo que indica que la conjugación de los Ac de detección con el oro se realizó de manera correcta (Ver figura 3 en anexo). A nivel del área del test se obtuvo color muy tenue y con resultados no reproducibles para las tiras de Proteus mirabilis y Staphylococcus saprophyticus. Las tiras para E. coli y Klebsiella detectaron la presencia de dichos microorganismos en varias réplicas pero siempre el color obtenido fue muy tenue. Se probaron distintas concentraciones de ambos anticuerpos, con distintas concentraciones bacterianas, así como con diferentes cepas de dichas especies, sin obtener cambios en el resultado. También se probó preparar las muestras lisando por calor o de manera química a las cepas pero la señal de color fue similar a los ensayos sin lisar. En la figura 4 se observan los resultados obtenidos de la tira de flujo lateral casera (ver figura 4 en anexo).

Debido a las limitantes en la detección de los uropatógenos mediante ésta metodología, se planteó como alternativa poner a punto la detección de Escherichia coli en orina (por ser el uropatógeno presente en más del 80% de los casos de ITU) utilizando un kit comercial para el desarrollo de TI de flujo lateral Universal.

### **3. Resultados del TI de flujo lateral comercial:**

Para la puesta a punto de dicha tira se utilizó el Ac de captura de E. coli y de detección anti LPS, y se trabajó con distintas suspensiones de E. coli uropatogénicas de nuestra colección de cepas cultivadas en LB. Se preparó un control negativo de LB sin bacterias. Se obtuvieron resultados positivos a los 20 minutos en todos los ensayos con bacterias, y en el caso de los controles negativos sin bacterias se observó sólo una única línea a nivel del área de control, confirmando que el procedimiento se realizó de manera correcta. En la figura 5 se observan resultados positivos y negativos del TI (ver figura 5 en anexo).

Una vez puesta a punto se procedió a validar el TI con muestras de orina de pacientes con sospecha de ITU.

### **4. Validación del TI de flujo lateral comercial en muestras de orina.**

En total se estudiaron 161 muestras de orina. Inicialmente 56 muestras se estudiaron solo por TI y urocultivo con el objetivo de evaluar su funcionamiento y reacciones cruzadas con otras especies en orina.

EL TI fue positivo en 20 de 27 (74%) muestras que desarrollaron E. coli en el urocultivo, y en 1 caso en el que hubo desarrollo polimicrobiano en el urocultivo (dicho urocultivo presentaba predominio de colonias de E. coli). Para el resto de los microorganismos y en aquellas muestras sin desarrollo bacteriano en el urocultivo el TI fue negativo.

En la tabla 2 se observa el resultado del TI según los microorganismos detectados en el urocultivo (ver tabla 2 en anexo).

En una segunda etapa se estudiaron 105 muestras de orina mediante TI, TRO y urocultivo. En 51 de estas muestras, E. coli

fue aislada del urocultivo con un recuento mayor a 100000 UFC/ml. El resto de los urocultivos no presentaron desarrollo bacteriano.

El TI fue positivo en 38 de los 51 urocultivos positivos para E. coli. En 13 urocultivos con desarrollo de E. coli el resultado del TI fue negativo. Seis de los 54 urocultivos sin desarrollo dieron positivo mediante TI. La tabla 3 muestra los resultados del TI comparado con el urocultivo. La sensibilidad del TI fue 74,5%, especificidad 88,9%, VPP 86,3%, VPN 78,7%, precisión diagnóstica 81,9%, razón de verosimilitud positiva 6,7; razón de verosimilitud negativa 0,28 (ver tabla 3 en anexo)

Si comparamos los resultados de la TRO con el urocultivo, el test de TRO fue positivo en 42 de los 51 urocultivos con desarrollo de E. coli. En 15 muestras que no desarrollaron bacterias mediante urocultivo la TRO fue positiva (ver tabla 4). La sensibilidad de la TRO fue 82,3%, especificidad 72,2%, VPP 73,6%, VPN 81,2%, precisión diagnóstica 77,1%, razón de verosimilitud positiva 2,9, y negativa 0,2 (ver tabla 4 en anexo).

Por último analizamos el rendimiento del uso de ambos test de manera combinada comparándolo con el urocultivo. Cuarenta y ocho muestras de las 51 con urocultivo con desarrollo de E. coli fueron positivas por uno u otro test (TI y/o TRO), mientras que 18 muestras de las 54 sin desarrollo bacteriano por urocultivo fueron positivas mediante alguno de estos tests (ver tabla 5). La sensibilidad fue 94,1%, especificidad 66,7%, VPP 72,7%, VPN 92,3%, precisión diagnóstica 80%, razón de verosimilitud positiva 2,8, y negativa 0,08 (ver tabla 5 en anexo).

### **Conclusiones y recomendaciones**

La resistencia antibiótica es un problema creciente a nivel mundial y el uso irracional de los antibióticos es uno de los principales factores predisponentes. En Estados Unidos, un 15% de los antibióticos prescritos son para el tratamiento de las ITU (Waller 2018). En ITU el uso de antibióticos es adecuado solo en el 75% de los casos (Waller 2018). En un estudio realizado en Uruguay en población pediátrica solo en el 29,6% de los niños en los que existía sospecha de ITU (por síntomas o test de tamizaje positivos) fueron confirmadas mediante urocultivo. El 35% de dicha población recibió antibiótico innecesariamente (Kuster 2020).

Estos aspectos refuerzan la necesidad de contar con test de tamizaje rápidos, accesibles, fáciles de realizar y con mejor precisión diagnóstica.

En éste trabajo si bien se consiguió evaluar distintos Ac comerciales que detectan distintas especies de uropatógenos y desarrollar un prototipo de TI que funcionó para la detección de los uropatógenos evaluados, su interpretación presentó dificultades visuales. Creemos que algunos de los factores que pueden haber influido son el tipo de membrana utilizada ya que la velocidad en que migra la muestra puede alterar la reacción del Ac con el antígeno (no pudimos adquirir en el mercado membranas de nitrocelulosa de flujo intermedio como HF120), así como la manera de dispensar los Ac sobre la membrana (a forma de gota y no utilizando equipos que permiten colocar los reactivos de manera lineal en una concentración por mm de membrana ajustada). Estos parámetros afectan la visualización de la línea de color en el test.

Como alternativa al TI de producción propia se procedió evaluar un formato TI universal, comercial.

En éste estudio pudimos poner a punto un TI de flujo lateral para la detección de E. coli en orina, con mejor especificidad, valor predictivo positivo y precisión diagnóstica que la TRO que se utiliza habitualmente como técnica de tamizaje. El TI fue positivo en 6 de 54 (11%) muestras que no presentaron desarrollo en el urocultivo. No encontramos que esto pudiera relacionarse con la presencia de alguna característica específica de la orina (nitritos, leucocitos, vogel, sangre, cetonas, bilirrubinas, glucosa). Cada vez hay más estudios que evidencian la presencia de una microbiota urinaria, así como trabajos que describen la realización de un urocultivo expandido con mayor capacidad de detectar microorganismos que no son detectados por el urocultivo convencional (Pearce 2014, Price 2016). En el urocultivo convencional se siembran 10 ul de orina mientras que en el expandido el volumen aumenta a 100 ul, y se amplían los medios de cultivo y condiciones atmosféricas utilizadas. Una explicación para éstos casos de TI positivo y urocultivo sin desarrollo podría ser la presencia de E. coli en bajas cantidades, no detectadas por urocultivo convencional, ya que para el TI se utilizan 7,5 veces más de volumen de orina.

La combinación de ambas técnicas (TRO más TI) como método de tamizaje presenta una excelente sensibilidad (94%) y precisión diagnóstica (80%). Esta estrategia combinada reduciría el uso inadecuado de antibióticos. A su vez confirmar mediante el TI que el agente etiológico de la ITU es E. coli permitiría indicar un tratamiento antibiótico más ajustado según los perfiles de resistencia de dichos microorganismos que circulan en cada área.

## Referencias bibliográficas

- Burillo A, et al. 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:e86915.
- Davenport M, et al. 2017. New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections *Nat Rev Urol* 14(5): 296–310.
- DeFrances CJ, et al. 2008. 2006 National Hospital Discharge Survey. *Natl Health Stat Report*.30:1-20.
- Flores-Mireles, et al. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* 13(5): 269-84.
- Foxman B, et al. 2003. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am*; 17(2):227–241
- Foxman B, et al. 2000. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am J Epidemiol*; 151(12):1194–1205.
- Koljalg S, et al. 2009. Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotypic and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *J Clin Microbiol* 47: 99-105.
- Kuster N, et al. 2020. Interpretación de los tests de sospecha e inicio de la terapia antibiótica empírica en infecciones urinarias. *Arch Pediatr Urug* 2020; 91(1):34-41
- Le Saux N, et al. 2000. The benefits of antimicrobial prophylaxis to prevent urinary tract infections in children: a systematic review. *CMAJ*.163:523-9.
- Litwin MS, et al. 2007. *Urologic Diseases in America* (Government Printing Office, Washington, D.C).
- McCarter YS, et al. 2009. *Cumitech 2C, Laboratory diagnosis of urinary tract infections*. Coordinating ed., Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.
- O'Hanley P. 1996. In *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management* (eds Mobley, H. L. T. & Warren, J. W.) 405–425 (ASM Press, Washington, DC).
- Pearce MM. et al. 2014. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio* 5, e01283–14
- Pezzlo, M. 2014. Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections: Guidelines, Challenges and Innovations. *Clin Microb* 36(12): 87-93.
- Price TK, et al. 2016. The clinical urine culture: enhanced techniques improve detection of clinically relevant microorganisms. *J Clin Microbiol* 54:1216 –1222.
- Roberts KB, et al. 2011. Urinary tract infection: clinical practice guideline for the diagnosis and management of the initial UTI in febrile infants and children 2 to 24 months. *Pediatrics* 128(3): 595-10.
- Robino L, et al. 2014. Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping. *J Glob Antimic Resist* 2: 293-98
- Seija V, et al. 2010. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. *Rev*

Med Urug; 26: 14-24

Stamm W.E, et al. 1980. Causes of the acute urethral syndrome in women. N Engl J Med 303(8): 409.

Waller TA, et al. 2018. Urinary Tract Infection Antibiotic Resistance in the United States. Prim Care;45(3):455-66.

## **Licenciamiento**

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)