###

**POINT-OF-CARE WHITE PAPER | April 2022**

Rapid AST using nanofluidics

Как провести исследование чувствительности

к антимикробным препаратам в реальном времени

# Почему проблема резистентности важна?

В течение многих лет Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) информирует о растущей угрозе резистентности к антимикробным препаратам [1]. Появление и быстрое распространение устойчивых к противомикробным препаратам бактерий представляет реальную опасность практически во всех странах мира, поражая все категории пациентов. Важной характеристикой бактерий является их способность приспосабливаться к условиям окружающей среды. Однако высокие темпы развития резистентности тикам стали предметом беспокойства. Применение антибиотиков широкого спектра действия, назначение антибиотиков при небактериальных инфекциях, недостаточная диагностика и отсутствие программ управления и контроля в настоящее время становятся все более распространенным явлением. [2, 3].

Голоса, бьющие тревогу, в последние годы стали громче — и не без оснований. Если доступные в настоящее время антибиотики потеряют свою эффективность в лечении бактериальных инфекций, простые медицинские процедуры могут стать опасными для жизни. Другими словами, инфекции, которые в настоящее время поддаются лечению и считаются управляемыми, могут выйти из-под контроля, что ослабит эффективность доступных препаратов. Наш долг — рационализировать использование антибиотиков и использовать инструменты, чтобы избежать их неправильного использования до того, как их эффективность снизится и бактерии выиграют битву [4]. Рационализация использования антибиотиков также важна с точки зрения побочных эффектов

антибиотики способны уничтожать нормальную микрофлору, что повышает восприимчивость пациентов к другим инфекциям.

И последнее, но не менее важное: уменьшение инвестиций в исследования и разработку новых антибиотиков со стороны фармацевтической промышленности и биотехнологических компаний [5].

North America

317,000

Europe

390,000

Asia

4,730,000

Latin America

392,000

Africa

4,150,000

Oceania

22,000

Number of deaths

Mortality per 10,000 population

5 6 7 8 9 10 ›

***Рис. 1 Резистентность не знает границ. В случае отсутствия эффективных мер борьбы резистентность к антибактериальным препаратам может стать причиной 10 млн летальных исходов в мире к 2050 году*** *[2].*

# Значение диагностических тестов в борьбе с резистентностью

Лабораторная диагностика играет большую роль в рациональном назначении антибиотиков. Хорошо известные тесты на чувствительность к противомикробным препаратам являются надежными инструментами для фенотипического определения устойчивости к антибиотикам [6]. В настоящее время доступно несколько решений для определения чувствительности.

Культивирование выполняется в специализированных микробиологических лабораториях обученным персоналом. Большинство методологий, доступных в настоящее время, применялись десятилетиями. Они основаны на постановке антибиотикограмм путем мониторинга способности бактерий к росту в присутствии антибиотиков. Одним из критических моментов является необходимость наличия суточной культуры бактерий для постановки антибиотикограммы. Это обстоятельство приводит к запоздалому получению результатов, что, в свою очередь, приводит к назначению эмпирической терапии при подозрении на бактериальную инфекцию. Еще одним следствием позднего получения результатов является использование антибиотиков широкого спектра действия с учетом вероятности наличия бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Было подсчитано, что примерно 30% рецептов в кабинетах врачей и отделениях неотложной помощи являются ненужными, что могло бы быть предотвращено в случае доступности более быстрых диагностических методов [7].

Разработка новых тестов с акцентом на сокращение времени получения результатов является ключом к решению обозначенных выше проблем.



***Рис. 2*** *Существующие методы определения резистентности являются затратными по времени, а также требуют технической экспертизы.*

## Генотипирование против фенотипирования

Генотипирование (ПЦР) включает амплификацию специфических последовательностей, используя такие преимущества, как высокая чувствительность и специфичность, в идентификации генов резистентности. Однако генотипирование имеет некоторые недостатки. Помимо необходимости наличия специальных знаний и оборудования, данный метод не может выявлять новые механизмы устойчивости. Кроме того, наличие генов резистентности не всегда приводит к фенотипической (фактической) устойчивости.

Для получения результатов, обеспечивающих максимальную пользу для лечащего врача, усилия были смещены в сторону разработки новых фенотипических методологий определения чувствительности. Преимущество фенотипического подхода по сравнению с генотипированием заключается в том, что метод не имеет определенной мишени (например, ген устойчивости), вместо этого полагаясь на «поведение» бактериального штамма в реальных условиях. Тестируя фактический профиль резистентности бактерий, присутствующих в образце, можно получить информативные результаты применительно к конкретному штамму, вызывающему инфекцию.

Актуальные проблемы резистентности и методы их решения

Постоянно растущий уровень резистентности, в результате чего антибиотики теряют эффективность.

Слишком мало новых антибиотиков создается.

Существующие методы определения чувствительности требуют времени.

Интерпретация результатов определения чувствительности требует специальных знаний.

Отсутствие альтернативы вынуждает назначать эмпирическую терапию.

Эмпирическая терапия основана на назначении антибиотиков на основании статистических рисков, которых следует избегать при борьбы с резистентностью.

Генотипические vs фенотипические характеристики бактерий

Генотип – это генетический материал организма, т.е. е. гены, составляющие его геном. Фенотип относится к набору наблюдаемых характеристик индивидуума, который зависит от генотипа и окружающей среды.

В то время как методы генотипирования нацелены на идентификацию генов в геноме организма, фенотипические методы анализируют признаки, фактически проявляемые организмом. Таким образом, анализ резистентности на основе нанофлюидов, как и культуральные методы, можно отнести к методам фенотипического анализа, поскольку результат зависит от реакции бактерий на воздействие определенных антибиотиков – их фактического профиля резистентности.

## Нанофлюидика в определении резистентности

Традиционные методики определения резистентности требуют наличия бактериальных колоний. Результат можно учесть только тогда, когда количество бактерий достигло 107 клеток, а учитывая естественный рост и скорость деления бактерий, обычно подразумевается культивирование в течение 18-24 ч. Использование нанофлюидики позволяет оценивать рост бактерий до того, как сформируется бактериальная колония, измеряя рост как увеличение длины отдельных клеток, а не время, пока они не вырастут и не размножатся с образованием видимой колонии.

Этот деструктивный способ получения бактериальных культур позволяет обойти ограничения скорости роста бактерий в обычных культурах. Другими словами, использование нанофлюидики позволяет нам получать результаты роста бактериальных клеток в масштабе реального времени, а не макроскопических бактериальных колоний. Это является ключом к скорости анализа системы.

Преимущество данного способа измерения роста бактерий состоит также в возможности обнаружения бактерий в биологическом образце. Мониторинг роста отдельных клеток позволяет быстро определить бактериурию в образце — быстрее, чем при использовании обычного культивирования. Влияние исключения образцов с отрицательной бактериурией на щадящее лечение антибиотиками очевидно.

Применение нанофлюидики в микробиологии представляет собой новую парадигму в культивировании бактерий и открывает двери для проведения тестирования на наличие резистентности в масштабах одной клетки. Данная концепция обладает огромным потенциалом для сокращения времени до получения результатов и приближает нас к созданию диагностических инструментов, способных оказать быструю помощь в диагностике и лечении бактериальных инфекций [8].

## Как работает система?

Ядром системы анализа резистентности является наножидкостный чип, содержащий массив ловушек (наноканалов), частично закрытых с одного конца и открытых с другого, где они соединяются с центральным проточным каналом [9]. Поток пробы проталкивается через центральный канал и отдельные ловушки, которые случайным образом заполняются бактериями из пробы. Только одна бактерия или очень ограниченное количество бактерий остаются в ловушке каждого наноканала, т.к. поток через наноканал частично блокируется, когда он захватывает клетку.

Далее поток пробы заменяется забором питательной среды. По аналогии с потоком пробы среда для выращивания течет через центральный канал и отдельные ловушки, обеспечивая подходящую среду для роста бактерий. Отдельные бактериальные клетки, первоначально попавшие в наноканалы, будут расти вдоль канала. Поскольку ширина наноканала позволяет поместиться только одной бактериальной клетке, рост клеток приводит к образованию прямой линии клеток, которая в конечном итоге заполняет весь наноканал. Эта геометрия обеспечивает основу для измерения динамики бактериального роста, которое выполняется на уровне отдельных клеток.

На последующем этапе в разных группах наноканалов создаются разные условия. Каждый набор наноканалов, состоящий из нескольких сотен отдельных ловушек, может подвергаться воздействию различных условий, то есть различных антибиотиков и/или концентраций. Этого можно достичь с помощью сложной сети каналов, где каждый набор работает независимо от других. На этом этапе среда для выращивания протекает через резервуары с различными антибиотиками, высушенными в разных концентрациях, создавая разные условия в каждом наборе наноканалов.

Нанофлюидный чип

Среда без антибиотика Среды с антибиотиками

1 cm

Размер каждого наноканала: 1.5 × 60 µm

Общее число наноканалов в наночипе: 11,000

***Рис. 3*** *Поток образца через систему наноканалов. Различные условия (представленные разными цветами) применяются к каждой серии.*

Если бактериальный штамм чувствителен к антибиотику, который на него воздействует, рост клеток замедляется или они даже лизируются. Резистентные бактерии будут расти и размножаться, заполняя наноканал. Степень заполнения наноканалов при различных концентрациях обусловлена степенью устойчивости бактерий к антибиотику.

Система позволяет проводить параллельное тестирование нескольких антибиотиков в различных концентрациях, регистрируя скорость роста бактерий в отдельных ловушках и создавая несколько отдельных записей для одного условия. Затем эти данные обрабатываются для получения среднего влияния на рост множества различных бактерий, растущих в одних и тех же условиях. Воздействие сравнивается с влиянием эталонных условий без антибиотиков, поскольку разные образцы будут иметь разную нативную скорость роста независимо от лечения антибиотиками. Использование данных для различных концентраций антибиотиков позволяет рассчитать клиническую точку отсечения для бактерий.

Основные достоинства нанофлюидики в определении чувствительности

Тестирование единичных клеток

Детекция роста в реальном времени

Быстрое получение результатов – на уровне естественных физиологических процессов

Меньшая площадь по сравнению с традиционными микробиологическими методами

Анализ полностью автоматизирован, не требуются специальные знания, независим от оператора

Концепция «лаборатория на чипе»: небольшой размер, потенциал для тестирования у постели больного

Бактериальный рост в таких нанофлюидных каналах отслеживается оптическим обнаружением с использованием фазово-контрастной микроскопии. Нанофлюидный чип перемещается под микроскопом, создавая набор изображений, охватывающих тысячи отдельных ловушек, составляющих область анализа, по несколько сотен за один раз. Процесс повторяется каждые 30 секунд, что позволяет создавать видео для мониторинга роста отдельных клеток.

Алгоритм обработки данных имеет ключевое значение для интерпретации результатов. Непрерывный мониторинг клеточного роста на уровне отдельных клеток значительно ускоряет анализ в сравнении с обычным культивированием. Вместо того, чтобы ждать, пока вырастет колония бактерий, нанофлюидика позволяет отслеживать рост в реальном времени. Этот уникальный метод позволяет получать клинически значимые диагностические результаты в течение нескольких минут, чего невозможно достичь с помощью других методов определения чувствительности

## Проблемы использования нанофлюидики

Некоторые попытки инкубации бактерий в микро- и нанофлюидных установках освещаются в литературе [10]. Этот инновационный способ выращивания клеточных культур сопряжен с некоторыми проблемами из-за поведения жидкостей в масштабе нанофлюидики и анализа отдельных клеток. Одним из таких ограничений является сложность захвата отдельных клеток в нанофлюидной системе. В литературе представлены некоторые решения этой проблемы, большинство из которых включают предварительные этапы, такие как концентрирование бактериальных клеток. Вторым ограничением является неравномерная концентрация антибиотиков во время анализа при отсутствии постоянной подачи свежей среды. Также ограничением является сложность измерения скорости роста клеток с помощью оптических методов.

Relative length (μm)

33

22

11

0 20 40 60 0

20 40 60

Time (min) Time (min)

Resistant bacteria

susceptible bacteria

***Рис. 4a*** *Резистентные бактерии растут в соответствии с экспоненциальной тенденцией, если они устойчивы к применяемому антибиотику (1), в то время как их рост значительно снижается или даже прекращается, если штамм чувствителен к тестируемому антибиотику (2).*

***Рис. 4b*** *Бактерии растут в наноканалах. Резистентные бактерии растут вдоль наноканала, пока он полностью не заполнится. Чувствительные бактерии лизируются или демонстрируют очень низкую скорость роста.*

Миниатюризация системы требует высокой степени автоматизации, что накладывает определенные ограничения в плане идентификации некоторых видов бактерий. Некоторые факторы, такие как размер клеток или требуемые условия питательной среды, по-прежнему требуют анализа сложных образцов традиционными методами. Требуется тщательное сравнение с эталонными методами для обеспечения безопасного применения в клиническом контексте.

Из-за перечисленных ограничений реализация системы на основе нанофлюидики для выполнения тестов на чувствительность является далеко не тривиальной задачей. Система, которую мы представляем, закладывает основу для диагностического устройства, использующего современную, высокочувствительную и быструю технологию. Преимущества системы заключаются не только в ее способности захватывать отдельные клетки, но и в точном контроле скорости роста клеток с точки зрения клеточного деления и роста клеток. Система также позволяет избежать необходимости предварительной обработки проб.

Данная технология позволит сделать определение чувствительности доступным за пределами микробиологической лаборатории, что существенно повысит качество диагностики для значительного числа пациентов.

## Взгляд в будущее

Как можно применить AST на основе нанофлюидики в повседневной практике? Эта технология станет основой для инновационных диагностических устройств «лаборатория на чипе». В сочетании с искусственным интеллектом или программным обеспечением это позволит до некоторой степени интегрировать знания в области клинической микробиологии. Разработка полностью автоматизированной системы позволит устранить зависимость от оператора, типичную для сложных этапов анализа в традиционных методах определения чувствительности. По сути, нанофлюидная система сможет в определенной степени перенести специализированные лабораторные микробиологические методы на кремниевый чип.

Тем не менее, данная технология определенно не предназначена для замены микробиологических лабораторий. Определенные факторы ограничивают ее потенциал, в том числе многочисленные сложности микробиологических процедур и биологические различия видов.

Тем не менее, основные преимущества, изложенные выше, делают эту технологию отличным кандидатом для создания нового класса устройств для тестирования в месте оказания медицинской помощи (POCT). Уменьшенный размер, независимость от оператора, простота использования и быстрые результаты — классические особенности диагностических инструментов POCT. Объединение нанотехнологий и анализа данных делает доступным быстрое тестирование, что, в свою очередь, открывает новые диагностические возможности.

В повседневной практике возможность использования устройства для тестирования у постели больного представляет уникальный инструмент для выбора антибиотиков, адаптированных к каждому инфекционному эпизоду. Предоставление этой информации лечащему врачу и доступ к пациенту являяются ключевыми факторами в борьбе с резистентностью. Быстрые результаты позволят использовать антибиотики в тех случаях, когда они остаются эффективными, тем самым продлевая срок их полезного использования, сохраняя резервные («последние средства») и снижая затраты на лекарства.

Чтобы понять потенциал нанофлюидики в диагностике ТЧА, подумаем о некоторых инфекционных заболеваниях, привлекающих внимание. Например, рассмотрим критическую ценность времени при диагностике сепсиса, когда на счету каждая минута. Можно было бы увидеть существенную пользу для практического здравоохранения, если бы цистит — наиболее распространенная инфекция мочевыводящих путей и одно из основных заболеваний, приводящих к назначению антибиотиков, — диагностировался бы с помощью такой технологии в условиях, близких к пациенту.

Sysmex стремится развивать будущее диагностики и обеспечивать здравоохранение передовыми инструментами, которые предлагают очевидную дополнительную ценность для врача и для пациента. Использование нанофлюидных инструментов в практике врача может изменить правила игры. Ведь только изменив правила игры, мы можем вывести диагностику на новый уровень.

15 min

Interview findings

Determination of bacteriuria

15–30

min

Specific AB

Current diagnostic workflow

1 day

1 day

FIRST VISIT TO THE PHYSICIAN

CLINICAL LABORATORY

(Outsorcing patient samples and waiting time approx. 3–4 days)

Sysmex rapid AST diagnostic workflow

Specific AB

Results to physician

AST

Urine culture

Wait for result Broad-spectrum AB

Urine analysis qualitative

Interview findings

***Рис. 5*** *Одним из потенциальных применений данной технологии может быть экспресс-тест образцов мочи. Текущий рабочий процесс диагностики ИМП требует отправки посева мочи во внешнюю лабораторию. Использование инновационной технологии может позволить сократить время диагностики до менее чем одного часа.*

# Литература

1. ***World Health Organisation (1978):*** *Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic-resistant enterobacteria. WHO, Geneva.*
2. ***O’Neill JO. (2014):*** *Review on Antimicrobial Resistance. Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. UK Government, London.*
3. ***World Health Organisation (2019):*** *New repot calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. WHO, Geneva.*
4. ***Centers for Disease Control and Prevention (2019):*** *Antibiotic Resistance Threats in the United States. US Department of Health and Human Services, Atlanta.*
5. ***Årdal C, et al. (2020):*** *Antibiotic development – economic, regulatory and societal challenges. Nat Rev Microbiol 18: 267–74.*
6. ***Puttaswamy S, et al. (2018):*** *A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. Arch Clin Microbiol 9 (3).*
7. ***Brito Goulart D. (2021):*** *Urinary tract infection caused by antibiotic- resistant uropathogenic Escherichia coli: a major public health concern. Res Soc Dev 10 (16).*
8. ***Klein A, Dietzel A. (2021):*** *Microfluidic Systems for Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology. Springer, Berlin.*
9. ***Baltekin Ö, et al. (2017):*** *Fast antibiotic susceptibility testing (FASTest) based on single cell growth rate measurements. bioRxiv.*
10. ***Qin N, et al. (2020):*** *Microfluidic technology for antibacterial resistance study and antibiotic susceptibility testing: review and perspective. ACS Sensors 6 (1): 3–21.*

You can download our white papers from our website:

[**www.sysmex-europe.com/whitepapers**](http://www.sysmex-europe.com/whitepapers)

**Sysmex Europe SE**

EN.N.05/22

Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany · Phone +49 40 52726-0 · Fax +49 40 52726-100 · info@sysmex-europe.com · [**www.sysmex-europe.com**](http://www.sysmex-europe.com/)

You will find your local Sysmex representative’s address under [www.sysmex-europe.com/contacts](http://www.sysmex-europe.com/contacts)