

AST rápido usando nanofluídica

Cómo realizar un test de susceptibilidad antibiótica (AST) en tiempo real

¿Por qué debemos preocuparnos por las resistencias a los antimicrobianos?

Durante muchos años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha emitido advertencias sobre la creciente amenaza que representan la resistencia a los antimicrobianos (AMR) [1]. La aparición y rápida propagación de las bacterias resistentes a los antibióticos representan un peligro real: se puede observar en casi todos los países del mundo y afecta a todo tipo de pacientes. Una característica innata de las bacterias es su capacidad para adaptarse a su ambiente. Sin embargo, el ritmo de su adaptación a los antibióticos y el desarrollo de resistencias está estrechamente relacionado con el uso excesivo de estos medicamentos. Este ritmo de adaptación se ha convertido en una cuestión preocupante. Debido al uso generalizado de antibióticos de amplio espectro, al uso inadecuado de antibióticos para infecciones no bacterianas, a un diagnóstico insuficiente y a la falta de programas de gestión, la resistencia a los antimicrobianos supone un problema cada vez mayor [2, 3].

Las voces que hacen sonar la alarma se han vuelto más fuertes en los últimos años, y con razón. Si los antibióticos disponibles actualmente pierden su eficacia, las infecciones que actualmente son tratables y se consideran manejables podrían estar fuera de control, debilitando el poder de los

medicamentos disponibles. Es nuestro deber racionalizar el uso de antibióticos y utilizar herramientas para evitar su mal uso antes de que su eficacia disminuya y las bacterias ganen la batalla [4]. La racionalización del uso de antibióticos también es relevante en términos de sus efectos secundarios: los antibióticos también atacan a la flora bacteriana beneficiosa en nuestro cuerpo, lo que podría aumentar la vulnerabilidad del paciente en nuevas infecciones.

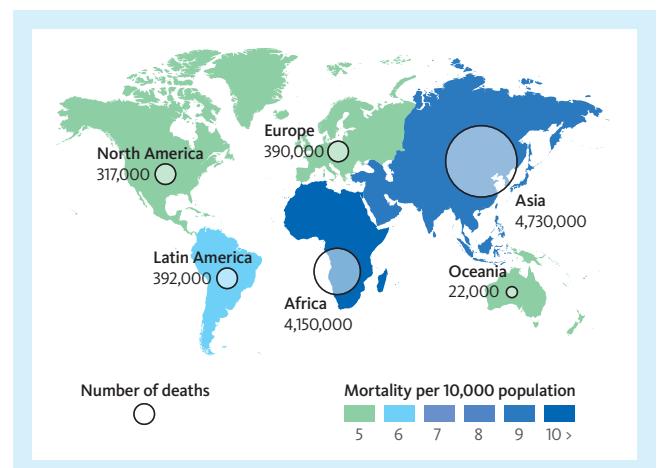


Fig. 1 La AMR no conoce límites. Si no se ponen medidas efectivas globales pronto, la AMR causará hasta 10 millones de muertes en 2050.

Por último, pero no menos importante, la industria farmacéutica y la biotecnología están invirtiendo menos en investigación y desarrollo de nuevos antibióticos [5].

El papel del diagnóstico en la lucha contra la AMR

El diagnóstico juega un papel importante en la prescripción racional de antibióticos. Las conocidas pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (AST) son herramientas fiables para la determinación fenotípica de la resistencia a antibióticos [6]. Hay varias soluciones disponibles en el mercado para la realización del AST.

Los cultivos bacterianos suelen realizarse en laboratorios de microbiología especializada por personal capacitado. La mayoría de las metodologías disponibles que hoy conocemos se han aplicado durante décadas. Están basadas en generar antibiogramas mediante la monitorización de la capacidad de las bacterias para crecer en el entorno al que están expuestas (es decir, exposición a los antibióticos). Uno de los puntos críticos en situaciones urgentes es la necesidad de un cultivo nocturno antes de la propia AST. Este retraso en la disponibilidad de los resultados de la AST se traduce en un diagnóstico clínico tardío, que a su vez conduce al uso recurrente de terapia empírica para hacer frente a sospechas de infecciones bacterianas. Otra consecuencia de esta prolongación diagnóstica es el uso de antibióticos de amplio espectro para cubrir la posibilidad de haya bacterias resistentes a múltiples medicamentos en la infección. Se ha estimado que aproximadamente el 30 % de las recetas en consultorios médicos y urgencias son innecesarias, y podría mejorarse si hubiera herramientas de diagnóstico más rápidas [7].

El desarrollo de métodos novedosos para la realización de AST con el foco en la reducción del tiempo de obtención de resultados es clave para el avance de herramientas diagnósticas. Sin afectar a la calidad, estas soluciones.



Fig. 2 Los métodos de diagnóstico AST actuales a menudo suponen un consumo elevado de tiempo y requieren experiencia técnica.

Los desafíos actuales de la AMR y métodos AST disponibles

- Tasas de resistencia cada vez mayores, lo que provoca que los antibióticos pierdan su efecto y reducen las opciones de tratamiento.
- Se están desarrollando muy pocos antibióticos nuevos.
- Los métodos AST actuales implican un largo tiempo de análisis y requieren gran experiencia.
- La interpretación de los resultados de AST de un laboratorio de microbiología requiere conocimientos específicos y actualizados.
- La falta de alternativas diagnósticas hace que la terapia empírica sea el método estándar en muchos entornos.

La terapia empírica se basa en la prescripción de antibióticos que funcionan para el paciente basado en riesgos estadísticos, que deben evitarse para combatir la resistencia a los antimicrobianos.

Genotípico vs fenotípico

La AST genotípica utiliza métodos que incluyen la PCR de amplificación de secuencia específica, aprovechando su alta sensibilidad y especificidad, para identificar genes de resistencia. Sin embargo, las pruebas genotípicas tienen algunos inconvenientes. No sólo requiere experiencia avanzada y conocimientos especializados del equipo, sino que su enfoque en la secuencia genética de las bacterias significa que no puede detectar nuevos mecanismos de resistencia. Además, la presencia de genes de resistencia no siempre conduce a una resistencia fenotípica (real).

Para producir resultados que ofrezcan el máximo valor añadido para el médico que trata la infección, los esfuerzos se han desplazado hacia el desarrollo de nuevas metodologías fenotípicas de AST. La ventaja enfoque fenotípico sobre el análisis genotípico es que no es necesario centrarse en ninguna característica conocida de antemano (como un gen de resistencia), sino que depende del comportamiento de la bacteria en un entorno real. Probando el perfil de resistencia real de bacterias presentes en la muestra, es posible obtener resultados factibles, basados en la cepa particular que causa la infección.

Caracterización genotípica vs fenotípica

El genotipo es el material genético de un organismo, es decir, los genes que componen su genoma.

El fenotipo se refiere al conjunto de características observables de un individuo, que dependen del genotipo y del ambiente.

Si bien las metodologías de análisis genotípico apuntan a la identificación de genes dentro del genoma de un organismo, las metodologías fenotípicas analizan las características reales expresadas por el organismo. El AST basado en nanofluídica, como los métodos basados en el cultivo, pueden, por tanto, clasificarse como métodos fenotípicos de análisis, ya que el resultado depende de la respuesta de las bacterias cuando se exponen a ciertos antibióticos (su perfil de resistencia real).

AST mediante nanofluídica

Las metodologías AST convencionales requieren colonias de bacterias. El resultado sólo se puede leer cuando se forma una colonia de 10⁷ células y, dada la tasa natural de crecimiento y división de las bacterias, normalmente implica un cultivo durante la noche. El uso de nanofluidos, permite medir el crecimiento bacteriano antes de que se forme la colonia bacteriana, midiendo el crecimiento como extensión de la longitud de la célula individual, en lugar del tiempo hasta que crecen y se dividen para formar una colonia visible.

Esta forma disruptiva de realizar cultivos bacterianos hace posible evitar la limitación de la tasa de crecimiento bacteriano en los métodos convencionales. En otras palabras, el uso de nanofluidos nos permite obtener resultados a tiempo real gracias al crecimiento de células bacterianas, y no en el de las colonias bacterianas macroscópicas. Esta es la clave de la velocidad de análisis del sistema.

Esta forma de medir el crecimiento bacteriano también tiene la ventaja de detectar la existencia de bacterias en una muestra. La monitorización del crecimiento de células individuales hace posible determinar rápidamente bacteriuria en una muestra, más rápido que con cultivos convencionales. Está claro el impacto que puede tener descartar muestras negativas de bacteriuria en la moderación de tratamientos antibióticos.

La aplicación de nanofluidos en microbiología representa un nuevo paradigma en el cultivo bacteriano y abre la puerta a la realización AST en una sola célula. Al miniaturizar los cultivos bacterianos, somos capaces de reducir el tiempo hasta que se observan los efectos de los antibióticos sobre las bacterias. Este concepto tiene un enorme potencial para reducir el tiempo de obtención de resultados y nos acerca a la creación de herramientas diagnósticas capaces de proporcionar asistencia rápida en el diagnóstico y tratamiento de infecciones bacterianas [8].

¿Cómo funciona el sistema?

El núcleo del sistema de análisis AST es un chip nanofluídico que contiene una serie de trampas (nanocanales), parcialmente cerradas en un extremo y abiertas en el otro, donde se conectan a un canal de flujo central [9]. La muestra fluye a través del canal central, y los nanocanales se pueblan aleatoriamente con las bacterias de la muestra. Sólo una bacteria, o un número limitado de bacterias quedan atrapadas en cada nanocanal, ya que el flujo en ese nanocanal se bloquea parcialmente cuando una bacteria queda atrapada.

Después, el flujo de muestra se sustituye por la llegada de medio de cultivo. De manera análoga, el medio de cultivo fluye a través del canal central y los nanocanales, proporcionando un entorno de crecimiento adecuado para las bacterias. Las células bacterianas individuales atrapadas en los nanocanales crecerán a lo largo del cada uno.

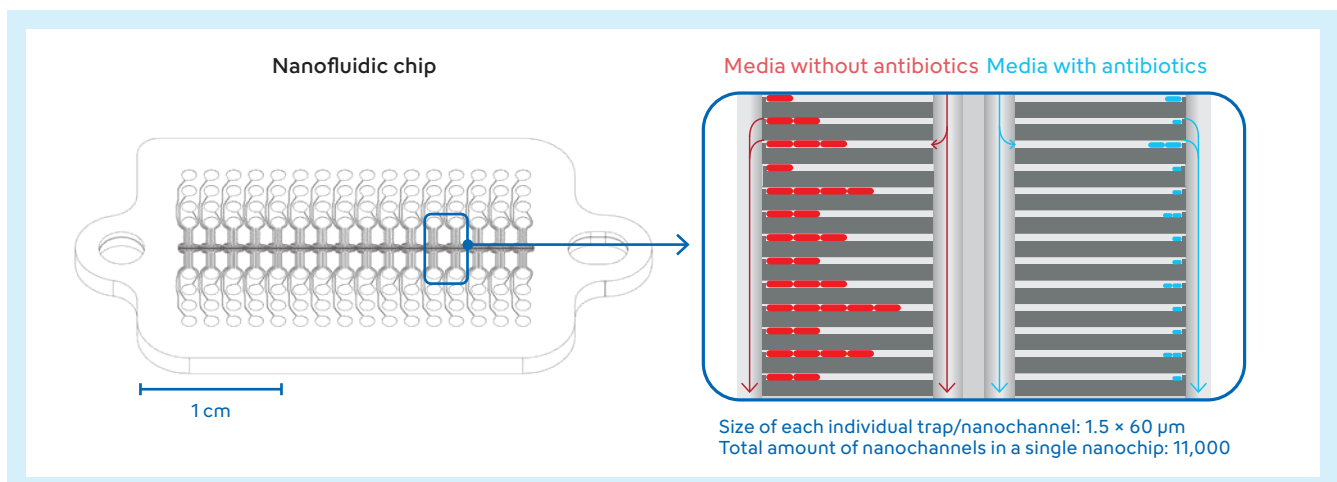


Fig. 3 Flujo de muestra a través del sistema de nanocanales. Se aplican diferentes condiciones a cada subconjunto.

Dado que el ancho del nanocanal solo permite que quepa una célula bacteriana, el crecimiento celular provoca la formación de una línea recta de células, que podría llenar la totalidad del nanocanal. Esta geometría proporciona la base para la medición de la dinámica de crecimiento bacteriano, que se realiza a nivel de una sola célula.

Posteriormente, se generan diferentes condiciones en diferentes grupos de nanocanales. Cada conjunto de nanocanales, que consta de varios cientos de trampas individuales, pueden estar expuestos a diferentes antibióticos y/o concentraciones. Esto puede lograrse mediante una compleja red de canales, para que cada conjunto opere independientemente de los demás. En este paso, el medio de cultivo fluye a través de depósitos con diferentes antibióticos en diferentes concentraciones, creando diferentes condiciones en cada conjunto de nanocanales.

Si una cepa bacteriana es susceptible al antibiótico al que está expuesta, las células mostrarán un crecimiento reducido o incluso se lizarán. Las bacterias resistentes crecerán y se multiplicarán, llenando así el nanocanal. La medida en la que los nanocanales se llenan en diferentes concentraciones está condicionado por el grado de resistencia de las bacterias al antibiótico.

El sistema permite las pruebas paralelas de varios antibióticos en diferentes concentraciones, registrando la tasa de crecimiento bacteriano individual en los nanocanales y generando múltiples registros individuales para cada condición. Estos datos luego se procesan para generar un promedio de crecimiento de muchas bacterias diferentes que crecen bajo la misma condición. El resultado se compara con el de las condiciones de referencia sin antibióticos, ya que muchas muestras tendrán diferentes tasas de crecimiento independientemente del tratamiento con antibióticos. Usando los datos de diferentes concentraciones de antibióticos podemos calcular el punto de sensibilidad de la bacteria.

El crecimiento bacteriano en los nanocanales se controla mediante detección óptica, mediante microscopía de contraste de fases. El chip de nanofluídica se mueve debajo del microscopio para generar un conjunto de imágenes cubriendo los miles de trampas individuales que constituyen el área de análisis, unos cientos cada vez. El proceso se repite cada 30 segundos, lo que permite la creación de un video para monitorizar el crecimiento celular individual.

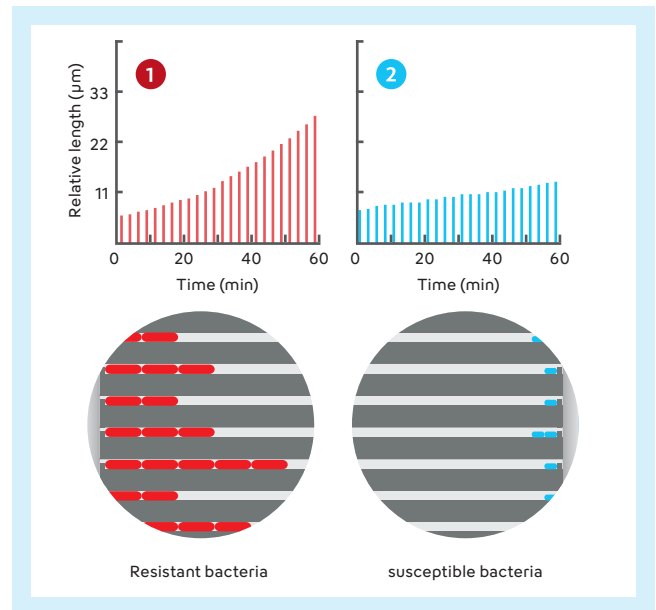


Fig. 4a Crecimiento de bacterias resistentes, siguiendo una tendencia exponencial cuando son resistentes al antibiótico aplicado (1), mientras que su crecimiento es más reducido, o se detiene, si la cepa es susceptible al antibiótico (2).

Fig. 4b Crecimiento bacteriano en los nanocanales. Las bacterias resistentes crecen a lo largo del canal hasta que se llena. Las bacterias sensibles se lisan o muestran una baja tasa de crecimiento.

El algoritmo de procesamiento de datos es clave para la interpretación de resultados. La monitorización continua del crecimiento celular a nivel de una sola célula acelera significativamente este análisis en comparación con los cultivos bacterianos convencionales. En lugar de esperar a que crezca una colonia bacteriana, los nanofluidos permiten una especie de seguimiento del crecimiento en tiempo real. Esta característica única hace posible generar resultados clínicamente relevantes en cuestión de minutos: ¿qué otros métodos AST lo pueden lograr?

Ventajas clave de los nanofluidos AST

- AST de células individuales
- Detección de crecimiento en tiempo real
- AST más rápido: tan rápido como la respuesta biológica al antibiótico
- Huella reducida en comparación con la microbiología convencional
- Análisis totalmente automatizable: no se necesita experiencia para el uso y es independiente del operador
- Concepto de laboratorio en un chip: tamaño pequeño, potencial para POCT

Retos del uso de nanofluídica

Hay algunos intentos de incubación de bacterias en microfluidos y nanofluidos que destacan en la literatura científica [10]. Esta forma innovadora de realizar cultivos celulares presenta algunos desafíos debido al comportamiento de los fluidos en la escala de nanofluídica y el análisis de células individuales. Una de esas limitaciones es la dificultad de capturar células individuales en el sistema nanofluídico. La literatura también proporciona algunas soluciones para esto, la mayoría de las cuales implican pasos preanalíticos como la preconcentración de las células bacterianas. La segunda limitación es la concentración irregular de antibióticos durante el análisis si no se puede mantener un suministro constante de medio fresco. La última limitación clave es la dificultad para medir la tasa de crecimiento celular utilizando métodos de detección óptica.

La miniaturización del sistema requiere un alto grado de automatización, lo que presenta ciertas limitaciones a la hora de identificar algunas especies bacterianas. Si bien el sistema se puede configurar para ofrecer una clasificación sólida de ciertas especies bacterianas, no es fácil generar un ambiente donde todos los potenciales patógenos puedan crecer. Varios factores, como el tamaño de las células o la necesidad de medios de cultivo específicos, hacen que el análisis de muestras complejas se lleve a cabo en el laboratorio de microbiología. El conocimiento y la variedad de herramientas disponibles para los microbiólogos, seguirán desempeñando un papel importante y los nanofluidos no los reemplazarán. Es necesaria una comparación amplia con los métodos de referencia, que garantice la aplicación segura en el contexto clínico.

Debido a estas limitaciones, la implementación de un sistema basado en nanofluidos para AST está lejos de ser una tarea trivial. El sistema que presentamos ha sido diseñado para superar esos desafíos y sienta las bases para un dispositivo de diagnóstico que utiliza esta tecnología altamente sensible y rápida. Las ventajas de este sistema radican no sólo en su capacidad para capturar células individuales, sino también en el seguimiento preciso de la tasa de crecimiento de las células en términos de división celular y del crecimiento celular. Este sistema también evita el pretratamiento de la muestra.

Estas son características fundamentales para acercar la tecnología a un dispositivo de diagnóstico médico. Esta tecnología proporciona una herramienta clave para que el AST esté disponible en ubicaciones fuera del laboratorio de microbiología, lo que supone un aumento significativo en la calidad del diagnóstico para un número considerable de pacientes.

Mirando al futuro

¿Cómo se puede aplicar la AST basada en nanofluidos a la práctica diaria? Esta tecnología será la base de un innovador dispositivo de laboratorio en un chip. Cuando se combine con inteligencia artificial, permitirá la integración de conocimientos de microbiología hasta cierto punto. Al desarrollar un sistema completamente automatizado, es posible eliminar la dependencia del operador en pasos de análisis complejos en el AST convencional. En esencia, este sistema de nanofluidos puede, hasta cierto punto, incorporar métodos de laboratorio de microbiología en chip de silicio.

Sin embargo, una cosa debería quedar clara: esta tecnología no pretende reemplazar a los laboratorios de microbiología. Ciertos factores limitan su potencial, como los complicados procedimientos de microbiología y las variaciones biológicas en las especies. Vasto número de patógenos potenciales, sus diferentes comportamientos y múltiples posibilidades de tratamiento limitan el uso a dedicadas aplicaciones.

Sin embargo, las ventajas clave descritas anteriormente hacen de esta tecnología un candidato para la creación de una nueva clase de dispositivos en el punto de atención (POCT). Tamaño reducido, independencia del operador, facilidad de uso y resultados rápidos son características clásicas de los instrumentos POCT. La unión de la nanotecnología y el análisis de datos hace posible la disponibilidad de un AST rápido.

Para infecciones cotidianas, la posibilidad de realizar pruebas cercanas al paciente proporciona una herramienta única para seleccionar antibióticos adaptados a cada episodio infeccioso. Poner esta información a disposición del clínico, y tan cerca del paciente es clave en la lucha contra las resistencias. Los resultados rápidos de AST nos permitirán utilizar antibióticos con tasas de resistencia elevadas en los casos en los que siguen siendo eficaces, prolongando así su vida útil, además de conservar los de reserva ('último recurso') y reducirá los costes de los medicamentos.

Para comprender el potencial de los nanofluidos en el diagnóstico de AST, pensemos en algunas enfermedades infecciosas que, por diferentes razones, atraen considerable atención. Por ejemplo, considere el valor crítico del tiempo en el diagnóstico de la sepsis, donde cada minuto cuenta. En otro contexto, podría tener un considerable impacto en la salud pública, si la cistitis – la infección del tracto urinario más común y una de las principales enfermedades que conducen al uso de antibióticos, fueran diagnosticadas utilizando dicha tecnología.

Sysmex está comprometida a desarrollar el futuro del diagnóstico proporcionando atención médica con herramientas avanzadas que ofrecen ventajas claras y valor para el clínico y para el paciente. Tener instrumentos de nano-

fluidos en la práctica de un médico parecería un cambio en las reglas del juego. De hecho, sólo cambiando las reglas del juego podremos llevar el diagnóstico al siguiente nivel.

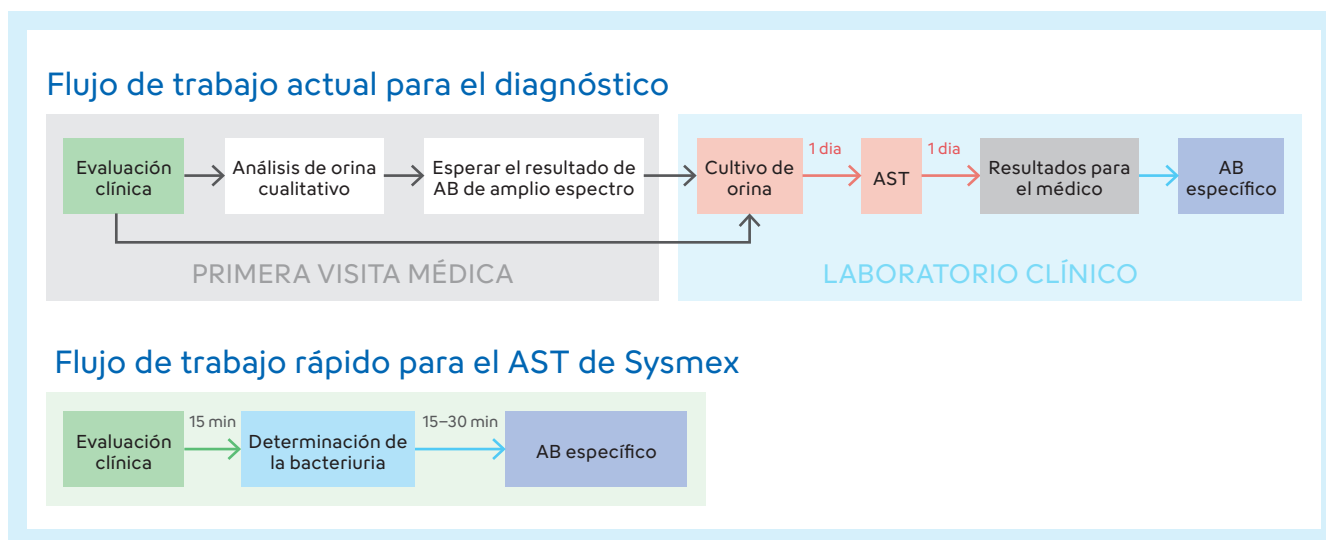


Fig. 5 Una aplicación potencial de esta tecnología podría ser el AST en muestras de orina. El flujo de diagnóstico de UTI actual requiere enviar el cultivo de orina a un laboratorio, lo que supone hacer una incubación durante la noche. Si llevamos esta innovadora tecnología a un analizador POCT podríamos acortar el tiempo de diagnóstico a menos de una hora

Referencias

- [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 report 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] **Árdal 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.](#)