



Antibiogramme rapide
grâce à la nanofluidique

Comment effectuer des tests de sensibilité aux antimicrobiens (TSA) en temps réel

Pourquoi devrions-nous nous préoccuper de la résistance aux antimicrobiens ?

Pendant de nombreuses années, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a émis des avertissements sur la menace croissante posée par la résistance aux antimicrobiens (RAM) [1]. L'émergence et la propagation rapide de bactéries résistantes aux antimicrobiens représentent un réel danger : elles s'observent dans presque tous les pays du monde et concernent tous les types de patients. La capacité des bactéries à s'adapter à leur environnement est une caractéristique innée chez elles. Cependant, leur rythme d'adaptation aux antibiotiques et le développement de résistances restent étroitement liés à la surconsommation de ces médicaments. Et c'est précisément ce rythme qui suscite l'inquiétude. En raison de l'utilisation généralisée d'antibiotiques à large spectre, de leur administration inappropriée dans le cadre d'infections non bactériennes, de diagnostics insuffisants et d'un manque de programmes de gestion, la résistance aux antimicrobiens s'impose désormais comme un phénomène en constante augmentation [2, 3].

Les voix s'élèvent de plus en plus pour tirer la sonnette d'alarme ces dernières années – et à juste titre. Si les antibiotiques dont nous disposons actuellement perdent leur efficacité à traiter les infections bactériennes, de simples procédures médicales pourraient mettre en danger la vie des patients. En d'autres termes, les infections, actuellement traitables et considérées comme gérables, pourraient s'avérer incontrôlables, en raison d'une baisse d'efficacité des médicaments disponibles. Il est de notre devoir de rationaliser l'administration des antibiotiques et de recourir à des outils pour éviter toute utilisation abusive de ces médicaments avant que leur efficacité ne décline et que les bactéries ne gagnent la bataille [4].

Rationaliser l'administration des antibiotiques est également pertinent au regard de leurs effets secondaires : ils s'attaquent également à la flore bactérienne bénéfique de notre organisme, augmentant ainsi la vulnérabilité du patient à de nouvelles infections.

Enfin, l'industrie pharmaceutique et les sociétés de biotechnologie ont réduit leurs investissements dans la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques [5].

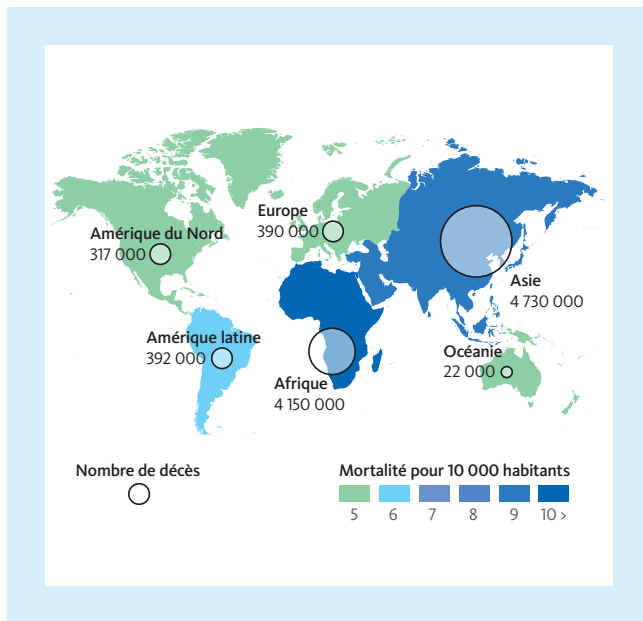


Fig. 1 La RAM ne connaît pas de frontières. Si des mesures efficaces à l'échelle mondiale ne sont pas mises en place rapidement, la RAM pourrait être la cause de 10 millions de décès dans le monde d'ici 2050 [2].

Le rôle du diagnostic dans la lutte contre la RAM

Le diagnostic joue un rôle majeur dans la prescription rationnelle des antibiotiques. Les tests de sensibilité aux antimicrobiens (TSA) bien connus sont des outils fiables pour la détermination phénotypique de la résistance aux antibiotiques [6]. Plusieurs solutions pour soutenir les performances des TSA sont disponibles sur le marché.

Les cultures bactériennes sont généralement réalisées dans des laboratoires de microbiologie spécialisés par du personnel formé. La plupart des méthodologies dont nous disposons aujourd'hui sont appliquées depuis des décennies. Elles reposent sur la génération d'antibiogrammes contrôlant la capacité des bactéries à se développer dans l'environnement auquel elles sont exposées (c'est-à-dire l'exposition aux antibiotiques). L'un des points critiques dans les situations de phase aiguë est la nécessité de procéder à une culture sur la nuit avant de réaliser le TSA en lui-même. Ce délai dans la disponibilité des résultats du TSA se traduit par un diagnostic clinique tardif qui, à son tour, conduit à l'administration récurrente d'une thérapie empirique pour traiter les suspicions d'infections bactériennes. Cet allongement du temps de diagnostic induit une autre conséquence : l'administration d'antibiotiques à large spectre supposée couvrir l'éventualité d'une infection par des bactéries multirésistantes. Selon des estimations, environ 30 % des prescriptions au sein des cabinets médicaux et des services d'urgence sont inutiles. Ce problème pourrait donc être résolu avec la disponibilité d'outils de diagnostic plus rapides [7].

Le développement de nouvelles méthodes soutenant les performances du TSA mettant l'accent sur la réduction du délai nécessaire à l'obtention des résultats est la clé des outils de diagnostic avancés. Sans impact sur la qualité, ces solutions apporteraient l'orientation nécessaire au traitement et, à terme, à la prescription d'antibiotiques.

Défis actuels de la RAM et des méthodes de TSA disponibles

- L'augmentation constante des taux de résistance, induisant une perte d'efficacité des antibiotiques et la réduction des options thérapeutiques.
- Le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques développés.
- Les longs temps d'analyse des méthodes de TSA actuelles et la nécessité de disposer d'une expertise approfondie en la matière.
- L'obligation de disposer de connaissances spécifiques et actualisées pour interpréter les résultats du TSA provenant d'un laboratoire de microbiologie.
- Le manque d'alternatives diagnostiques faisant de la thérapie empirique la norme dans de nombreux contextes.
- La thérapie empirique reposant sur la prescription d'antibiotiques efficaces pour le patient en fonction des risques statistiques, qu'il convient d'éviter pour lutter contre la RAM.



Fig. 2 Les méthodes actuelles pour l'antibiogramme sont souvent longues nécessitent également une expertise technique.

Génotypage vs phénotypage

Le TSA génotypique s'appuie sur des méthodes telles que l'amplification spécifique d'une séquence par PCR, sa sensibilité et sa spécificité élevées permettant ainsi d'identifier les gènes de résistance. Cependant, les tests génotypiques présentent certains inconvénients. Non seulement ils requièrent une expertise de pointe et des équipements spécialisés, mais leur ciblage sur une séquence génétique des bactéries entrave toute détection de nouveaux mécanismes de résistance. De plus, la présence de gènes de résistance ne conduit pas toujours à une résistance phénotypique (réelle).

Afin de produire des résultats offrant le maximum de valeur ajoutée pour le médecin traitant, les efforts se sont orientés vers le développement de nouvelles méthodologies phénotypiques de TSA. L'approche phénotypique par rapport à l'analyse génotypique a l'avantage de ne pas avoir besoin de cibler une caractéristique connue à l'avance (comme un gène de résistance), mais s'appuie davantage sur le comportement de la souche bactérienne dans un environnement réel. En testant le profil de résistance réel des bactéries présentes dans l'échantillon, il est possible de générer des résultats exploitables, fondés sur la souche particulière responsable de l'infection.

Caractérisation génotypique vs phénotypique des bactéries

Le génotype est le matériel génétique d'un organisme, en d'autres termes, les gènes qui composent son génome. Le phénotype désigne l'ensemble des caractéristiques observables d'un individu, qui dépendent du génotype et de l'environnement.

Si les méthodologies d'analyse génotypiques visent l'identification des gènes dans le génome d'un organisme, les méthodologies phénotypiques analysent, quant à elles, les caractéristiques réellement exprimées par l'organisme. Le TSA s'appuyant sur la nanofluidique, à l'instar des méthodes avec culture, peut donc être classé dans les méthodes d'analyse phénotypique, le résultat dépendant de la réponse des bactéries lors de leur exposition à certains antibiotiques – leur réel profil de résistance.

La nanofluidique rencontre le TSA

Les méthodologies des TSA conventionnels nécessitent des colonies bactériennes. Le résultat ne peut être lu qu'après la formation d'une colonie de 10^7 cellules formée ce qui, compte tenu de la croissance naturelle et du taux de division des bactéries, implique généralement des cultures d'une nuit. Grâce à l'utilisation de la nanofluidique, la croissance bactérienne peut être évaluée avant la formation d'une colonie, en mesurant la croissance sous la forme

d'une extension de la longueur des cellules individuelles au lieu de mesurer le temps de développement et de division nécessaire à la formation d'une colonie visible.

Cette manière disruptive de réaliser des cultures bactériennes permet de s'affranchir de la limitation du taux de croissance bactérienne dans les cultures conventionnelles. En d'autres termes, l'utilisation de la nanofluidique rend possible la génération de résultats à partir d'une échelle en temps réel de croissance des cellules bactériennes, et non de celle des colonies bactériennes macroscopiques. C'est la clé de la vitesse d'analyse du système.

Cette manière de mesurer la croissance bactérienne offre également l'avantage de détecter l'existence de bactéries dans un échantillon. Par le biais de la surveillance de la croissance cellulaire individuelle, il est possible de déterminer rapidement une bactériurie dans un échantillon – plus rapidement qu'avec les cultures conventionnelles. On voit clairement l'économie en termes de traitements antibiotiques qui découle de l'exclusion des échantillons à bactériurie négative.

L'application de la nanofluidique en microbiologie représente un nouveau paradigme dans la culture bactérienne et ouvre la porte à la réalisation de TSA sur une seule cellule. La miniaturisation des cultures bactériennes permet une réduction du temps nécessaire à l'observation des effets des antibiotiques sur les cellules bactériennes. Ce concept renferme un énorme potentiel pour réduire le délai d'obtention des résultats et nous rapproche de la création d'outils capables d'apporter une aide rapide au diagnostic et au traitement des infections bactériennes [8].

Comment fonctionne le système ?

Le cœur du système d'analyse des TSA est une puce nanofluidique qui contient un réseau de pièges (nanocanaux), partiellement fermés à l'une des extrémités et ouverts à l'autre extrémité, pour permettre leur connexion à un canal d'écoulement central [9]. Le flux d'échantillon est poussé à travers le canal central et les pièges individuels peuplés au hasard avec les bactéries de l'échantillon. Une seule bactérie, ou un nombre très limité de bactéries, reste piégée dans chaque nanocanal, car le flux à travers le nanocanal est en partie bloqué, une fois qu'une cellule est piégée.

Après cette étape de chargement, le flux d'échantillon est remplacé par un apport en milieu de croissance. À l'instar du flux d'échantillon, le milieu de croissance s'écoule à travers le canal central et les pièges individuels, fournissant alors un environnement favorable à la croissance des bactéries. Les cellules bactériennes individuelles, initialement piégées dans les nanocanaux, se développeront le long du canal. La largeur du nanocanal ne permettant l'intégration que d'une seule cellule bactérienne, la croissance cellulaire provoque la formation d'une ligne droite de cellules, qui finit par remplir la totalité du nanocanal. Cette géométrie donne une base pour mesurer la dynamique de croissance bactérienne, qui se produit au niveau de la cellule unique.

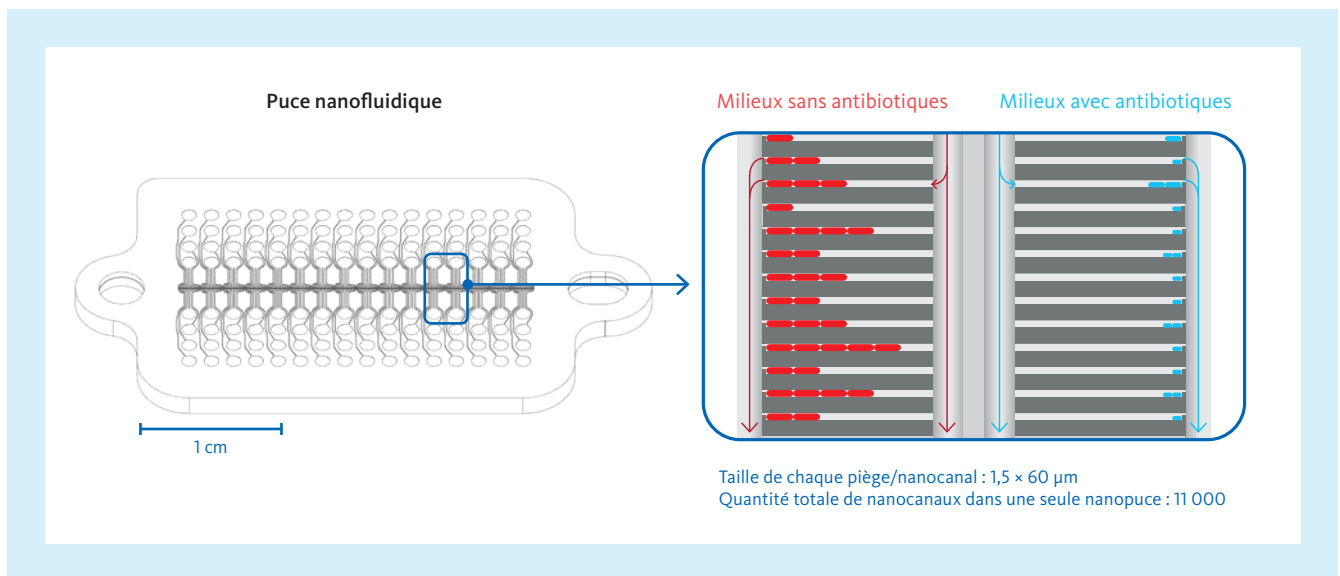


Fig. 3 Flux d'échantillon à travers le système de nanocanaux. Différentes conditions (représentées par les différentes couleurs) sont appliquées à chaque sous-ensemble.

Dans un second temps, différentes conditions sont testées dans différents groupes de nanocanaux. Chaque ensemble de nanocanaux, composé de plusieurs centaines de pièges individuels, peut permettre l'exposition à différentes conditions, en d'autres termes à différents antibiotiques et/ou à différentes concentrations. Ceci peut être réalisé au moyen d'un réseau complexe de canaux, chaque ensemble fonctionnant indépendamment des autres. Dans cette étape, le milieu de croissance s'écoule à travers des réservoirs contenant différents antibiotiques sous forme sèche à différentes concentrations, créant des conditions différentes dans chaque ensemble de nanocanaux.

Si une souche bactérienne est sensible à l'antibiotique auquel elle est exposée, les cellules présenteront une croissance réduite, voire un phénomène de lyse. Les bactéries résistantes vont croître et se multiplier, remplissant ainsi le nanocanal. Le degré de remplissage des nanocanaux à différentes concentrations est conditionné par le degré de résistance des bactéries à l'antibiotique.

Le système permet de tester facilement et parallèlement plusieurs antibiotiques à diverses concentrations, en enregistrant le taux de croissance bactérienne dans les pièges individuels et en générant plusieurs enregistrements individuels pour une seule condition. Ces données sont ensuite traitées pour générer un impact de croissance moyen pour une multitude de bactéries différentes se développant dans les mêmes conditions. L'impact est comparé à celui des conditions de référence, sans antibiotiques, les différents échantillons présentant des taux de croissance natifs différents, quel que soit le traitement antibiotique. L'exploitation des données obtenues à partir des différentes concentrations d'antibiotiques permet ensuite de calculer le seuil de sensibilité clinique de la bactérie.

La croissance bactérienne dans de tels canaux nanofluidiques est contrôlée par détection optique, reposant sur la microscopie à contraste de phase. La puce nanofluidique se déplace sous le microscope pour générer un ensemble d'images couvrant les milliers de pièges individuels qui constituent la zone d'analyse, à raison de quelques centaines à la fois. Le processus est répété toutes les 30 secondes, aboutissant à la création d'une vidéo destinée à surveiller la croissance des cellules individuelles.

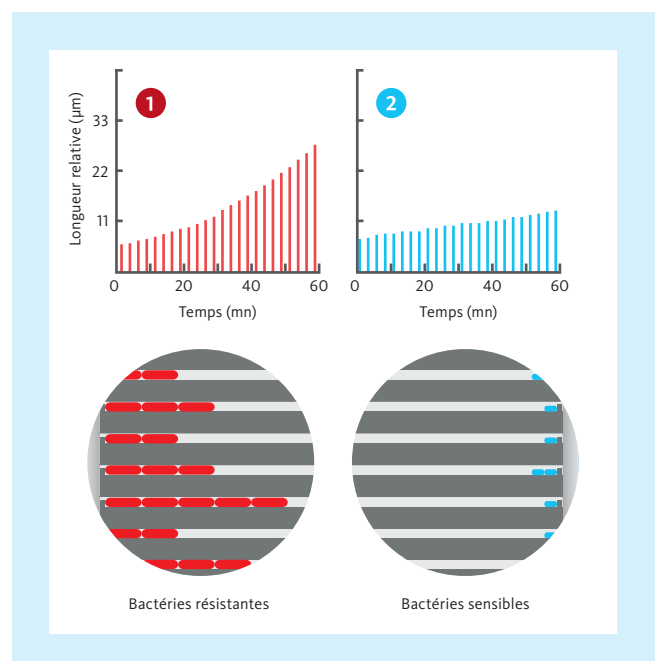


Fig. 4a Les bactéries résistantes se développent selon une tendance exponentielle lorsqu'elles sont résistantes à l'antibiotique appliqué (1); a contrario, leur croissance est très réduite, voire arrêtée, si la souche est sensible à l'antibiotique testé (2).

Fig. 4b Bactéries se développant dans les nanocanaux. Les bactéries résistantes se développent le long du nanocanal jusqu'à le remplir complètement. Les bactéries sensibles présentent un phénomène de lyse ou un taux de croissance très réduit

L'algorithme de traitement des données est essentiel pour l'interprétation des résultats. La surveillance continue de la croissance cellulaire au niveau d'une seule cellule accélère considérablement cette analyse par rapport aux cultures bactériennes conventionnelles. Au lieu d'attendre qu'une colonie bactérienne se développe, la nanofluidique permet une sorte de surveillance de la croissance en temps réel. Grâce à cette caractéristique unique, des résultats de diagnostic cliniquement pertinents peuvent être générés en quelques minutes, ce que les autres méthodes de TSA ne peuvent pas atteindre.

Principaux avantages de la nanofluidique dans le diagnostic par TSA

- TSA à partir de cellules individuelles
- Détection de croissance en temps réel
- TSA le plus rapide possible – aussi rapide que la réponse biologique à l'antibiotique
- Empreinte réduite par rapport à la microbiologie conventionnelle
- Analyse entièrement automatisable : aucune expertise nécessaire à l'utilisation et indépendance vis-à-vis de l'opérateur
- Concept de laboratoire sur puce : petite taille, potentiellement sur le lieu de prise en charge

Les défis relatifs à l'utilisation de la nanofluidique

Certaines tentatives d'incubation de bactéries dans des ensembles microfluidiques et nanofluidiques sont mises en évidence dans la littérature scientifique [10]. Cette façon innovante de réaliser des cultures cellulaires présente certains défis en raison du comportement des fluides à l'échelle nanofluidique et de l'analyse de cellules individuelles. L'une de ces limitations repose sur la difficulté à capturer des cellules individuelles dans le système nanofluidique. La littérature fournit également des solutions à ce sujet, dont la plupart impliquent des étapes pré-analytiques comme la pré-concentration des cellules bactériennes. La deuxième limite concerne la concentration irrégulière d'antibiotiques pendant l'analyse si un approvisionnement constant en milieu frais ne peut pas être maintenu. La dernière contrainte importante est la difficulté à mesurer le taux de croissance cellulaire à l'aide de méthodes de détection optique.

La miniaturisation du système implique un haut degré d'automatisation, ce qui présente certaines limites en termes d'identification de certaines espèces bactériennes. Si le système peut être configuré pour offrir une classification performante de certaines

espèces bactériennes, il n'est néanmoins pas toujours facile de générer un environnement où tous les agents pathogènes potentiels peuvent se développer. Plusieurs facteurs, tels que la taille des cellules ou les conditions requises du milieu de croissance, nécessitent encore l'analyse d'échantillons complexes dans un laboratoire de microbiologie. La connaissance et la variété des outils dont dispose le microbiologiste joueront toujours un rôle important et la nanofluidique ne s'y substituera pas. Une comparaison approfondie avec les méthodologies de référence s'impose pour garantir une application sûre dans le contexte clinique.

En raison de ces restrictions, la mise en œuvre d'un système reposant sur la nanofluidique pour les performances du TSA est loin d'être tâche facile. Le système que nous présentons a été conçu pour surmonter ces difficultés et constitue la base d'un appareil de diagnostic exploitant cette technologie très sensible et rapide. Les avantages de ce système résident non seulement dans sa capacité à capturer des cellules individuelles, mais également dans le suivi précis du taux de croissance des cellules en termes de division cellulaire et de croissance cellulaire. Ce système s'affranchit également de la nécessité d'un prétraitement de l'échantillon.

Ce sont des caractéristiques fondamentales pour rapprocher la technologie d'un dispositif de diagnostic médical. Cette technologie fournit un outil clé mettant l'antibiogramme à la disposition de centres extérieurs au laboratoire de microbiologie, ce qui augmentera significativement la qualité des diagnostics pour un nombre considérable de patients.

Regarder vers l'avenir

Comment le TSA, s'appuyant sur la nanofluidique, peut-il être intégré à la pratique quotidienne ? Cette technologie servira de base à des dispositifs de diagnostic innovants de type laboratoire sur puce. Combinée à l'intelligence artificielle ou à un logiciel compilant des connaissances, elle permettra, dans une certaine mesure, l'intégration des connaissances en microbiologie clinique. Le développement d'un système entièrement automatisé permet de se libérer de la dépendance vis-à-vis de l'opérateur, typique des étapes d'analyse complexes des méthodes de TSA conventionnelles. Par essence, ce système nanofluidique peut, dans une certaine mesure, apporter des méthodes de laboratoire de microbiologie dédiées sur une puce de silicium.

Pourtant, les principaux avantages décrits ci-dessus font de cette technologie un candidat exceptionnel pour la création d'une nouvelle classe d'appareils de test sur le lieu de prise en charge (POCT). Taille réduite, indépendance vis-à-vis de l'opérateur, facilité d'utilisation et résultats rapides sont les caractéristiques classiques des instruments de diagnostic POCT. L'association de la nanotechnologie et de l'analyse des données permet une disponibilité rapide du TSA, ce qui, en retour, offre de nouvelles opportunités sur le lieu de prise en charge.

Pour les infections du quotidien, se doter d'un dispositif de dépistage proche du patient offre la possibilité unique de sélectionner des antibiotiques adaptés à chaque épisode infectieux. La mise à disposition de ces informations pour le clinicien traitant et au plus près du patient est essentielle dans la lutte contre la RAM. Les résultats rapides du TSA nous permettront d'utiliser des antibiotiques avec des taux de résistance élevés dans les cas où ils restent efficaces, prolongeant ainsi leur durée de vie utile, tout en conservant les antibiotiques de réserve (« dernier recours ») et en réduisant les coûts des médicaments.

Pour comprendre le potentiel de la nanofluidique dans le paysage du diagnostic par TSA, il suffit de penser à certaines maladies infectieuses qui, pour différentes raisons, suscitent une attention considérable. Par exemple, considérons la valeur critique du

temps dans le diagnostic d'une septicémie, où chaque minute compte. Dans un autre contexte, on pourrait voir un impact considérable en santé publique, si la cystite – l'infection urinaire la plus courante et l'une des principales maladies conduisant à la prescription d'antibiotiques – était diagnostiquée à l'aide d'une telle technologie dans un contexte proche du patient.

Sysmex s'engage à développer l'avenir du diagnostic et à fournir aux soins de santé des outils avancés qui offrent une valeur ajoutée évidente pour le clinicien et pour le patient. Disposer d'instruments nanofluidiques dans des cabinets médicaux ou des maisons de santé pourrait apparaître comme une idée révolutionnaire. En effet, ce n'est qu'en changeant les règles du jeu que nous pourrions faire passer le diagnostic au niveau supérieur.

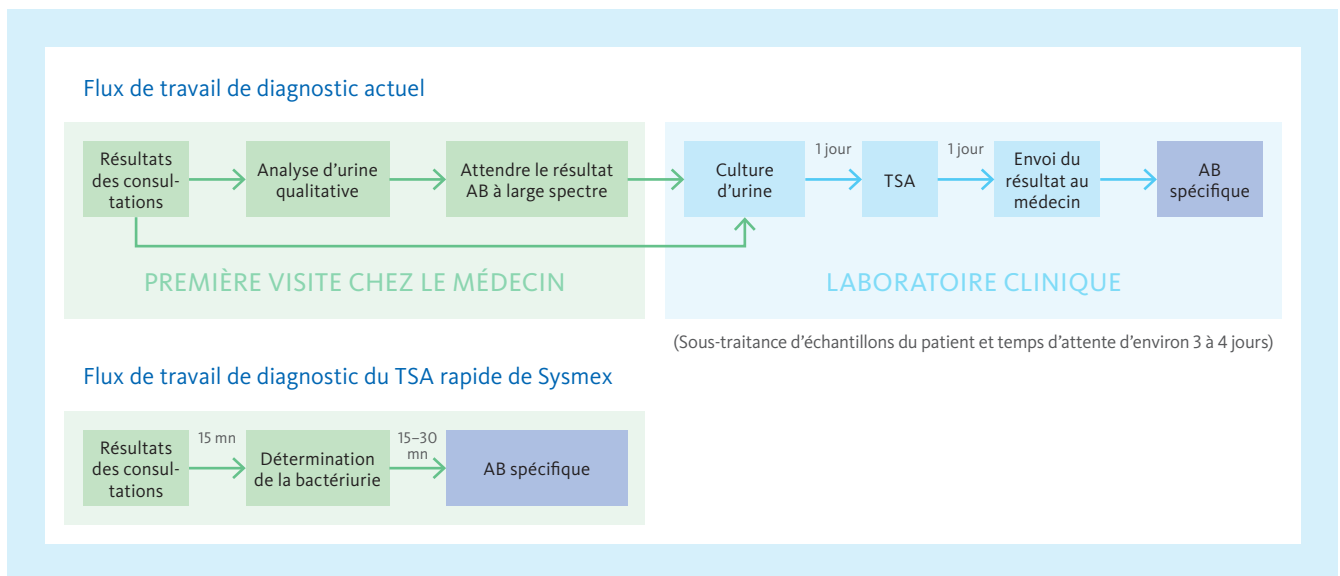


Fig. 5 Une application potentielle de cette technologie pourrait être le TSA rapide des échantillons d'urine. Le flux de travail de diagnostic de l'infection urinaire actuel nécessite l'envoi de la culture d'urine à un laboratoire externe. Les étapes d'incubation sur la nuit sont aujourd'hui obligatoires. L'intégration de cette technologie innovante dans un appareil sur le lieu de prise en charge pourrait permettre de réduire le temps de diagnostic à moins d'une heure.

Références

- [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] **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.

Nos white papers sont téléchargeables sur notre site Internet :

www.sysmex.fr/whitepapers