

Snelle detectie van antimicrobiële resistentie met nieuwe technieken (LC-MS/MS)

7-12-2020

De bouwstoffen van bacteriële cellen kunnen door blootstelling aan verschillende reagentia tot fragmenten worden afgebroken waarna de eiwitten door middel van een eiwitplitsend enzym (trypsine) in korte peptiden kunnen worden geknipt. Gebaseerd op de massa en elektrische lading van deze peptiden kunnen de oorspronkelijke eiwitten herkend worden door gebruik te maken van hoge-resolutie massa spectrometrie. Onderzoekers Wil Goessens en Dimard Foudraïne van het Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam (Erasmus MC) zijn bezig met onderzoek naar het gebruik van deze techniek om antimicrobiële resistentie in klinisch relevante bacteriën snel te detecteren.

Bacteriële gevoeligheids- en resistentie bepalingen worden nog steeds verricht door gebruik te maken van bacteriële groei-inhibitie-technieken. Een nadeel van deze technieken is de tijd die nodig is om van een positieve kweek tot een uitslag te komen. Daarom zijn alternatieve technieken nodig om bacteriële resistentie sneller aan te tonen (1).

De meeste resistentie wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van antibiotica-modificerende dan wel -afbrekende enzymen, al of niet in combinatie met het verlies van porine-eiwitten ('poorten' die antibiotica de bacteriële cel binnenlaten) en de aanwezigheid van efflux pompen (eiwitten die antibiotica uit de bacteriële cel pompen). Een techniek die bij uitstek geschikt is voor de detectie en karakterisatie van dit soort eiwitten is massaspectrometrie (MS). Op het Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam (Erasmus MC), maken onderzoekers Dimard Foudraïne (aios medische microbiologie) en Wil Goessens (medisch microbiologisch onderzoeker), gebruik van hoge-resolutie MS voor de detectie van deze antimicrobiële resistentiemechanismen.

In veel laboratoria wordt massaspectrometrie gebruikt voor de identificatie van micro-organismen middels de MALDI-TOF. Helaas is deze echter niet goed in staat om resistentiemechanismen te detecteren. Dit komt doordat de eiwitten en eiwitfragmenten van te voren niet van elkaar gescheiden worden en de resolutie van de MALDI-TOF MS beperkt is (2).

Hoge-resolutie tandem massaspectrometrie

Echter, de beperkingen van MALDI-TOF MS worden tenietgedaan wanneer gebruik wordt gemaakt van vloeistofchromatografie in combinatie met hoge-resolutie-tandem-massaspectrometrie (LC-MS/MS). Door bacteriën eerst te lyseren en daarna de eiwitten te digesteren middels trypsine ontstaan peptiden. Vervolgens kunnen deze peptiden van elkaar gescheiden worden middels vloeistofchromatografie (figuur 1) en direct daarna sequentieel gemeten worden door MS (figuur 2). Doordat op voorhand specifieke peptiden zijn geselecteerd, kenmerkend voor de specifieke resistentiemechanismen, kunnen deze worden gefilterd door de eerste MS. Hierna worden deze peptiden gefragmenteerd en geanalyseerd door de tweede MS middels "parallel reaction monitoring" (PRM).

Het gebruik van MS-technieken om antimicrobiële resistentie te detecteren heeft behalve het voordeel dat resultaten binnen een paar uur beschikbaar zijn, als extra voordeel dat meerdere mechanismen tegelijkertijd gedetecteerd kunnen worden. Verder heeft het gebruik van deze techniek als voordeel dat het niet gebonden is aan het soort organisme - met andere woorden, het is toepasbaar voor opkweekbare bacteriën maar ook voor bijvoorbeeld gisten. Onderzoeker Wil Goessens (Erasmus MC) heeft deze techniek onder andere toegepast om succesvol mutaties

in de quinolon resistance determining region (QRDR) van *gyrA* te detecteren in *Salmonella* (3). Daarnaast heeft hij samen met onderzoeker Dimard Foudraine (Erasmus MC) deze techniek gebruikt om de carbapenemases KPC, OXA-48, NDM en VIM te detecteren (4) in *E. coli* en *K. pneumoniae*. Deze mechanismen zijn allemaal verantwoordelijk voor verschillende vormen van antimicrobiële resistentie. Op dit moment is verdere optimalisatie, validatie en daarnaast automatisatie noodzakelijk om deze technieken uiteindelijk geschikt te maken voor microbiologische laboratoria.

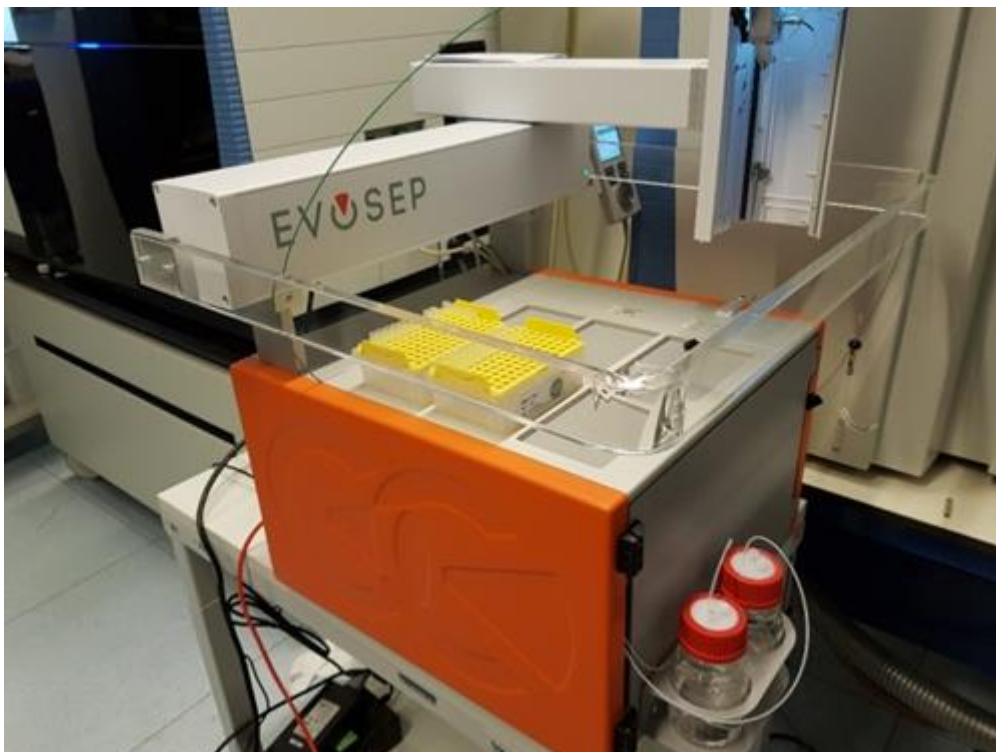
Onderzoekers

- 1) Dimard Foudraine - AIOS medische microbiologie (d.foudraine@erasmusmc.nl)
 - 2) Wil Goessens - Medisch microbioloog (w.goessens@erasmusmc.nl)
- Medische Microbiologie & Infectieziekten, Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam (Erasmus MC).

Referenties

1. The Review on Antimicrobial Resistance. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. 2016. <https://amr-review.org/>.
2. Welker M, van Belkum A. One System for All: Is Mass Spectrometry a Future Alternative for Conventional Antibiotic Susceptibility Testing? *Front Microbiol* 2019; 10: 2711.
3. Hassing RJ, Goessens WH, Zeneyedpour L et al. Detection of amino acid substitutions in the GyrA protein of fluoroquinolone-resistant typhoidal *Salmonella* isolates using high-resolution mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47: 351-6.
4. Foudraine DE, Dekker LJM, Strepis N et al. Accurate Detection of the Four Most Prevalent Carbapenemases in *E. coli* and *K. pneumoniae* by High-Resolution Mass Spectrometry. *Front Microbiol* 2019; 10: 2760.

Figuren



Figuur 1.

Vloeistofchromatografie door de Evosep One (Evosep, Odense, Denemarken). Deze fungeert als autosampler en ontzout de samples. Tegelijkertijd wordt sample carry-over geminimaliseerd.



Figuur 2.
Massaspectrometrie door de Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, de Verenigde Staten).