



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel applications of mass spectrometry-based proteomics in clinical microbiology

Fleurbaaij, F.

Citation

Fleurbaaij, F. (2018, September 27). *Novel applications of mass spectrometry-based proteomics in clinical microbiology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66032>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66032>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66032> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Fleurbaaij, F.

Title: Novel applications of mass spectrometry-based proteomics in clinical microbiology

Issue Date: 2018-09-27

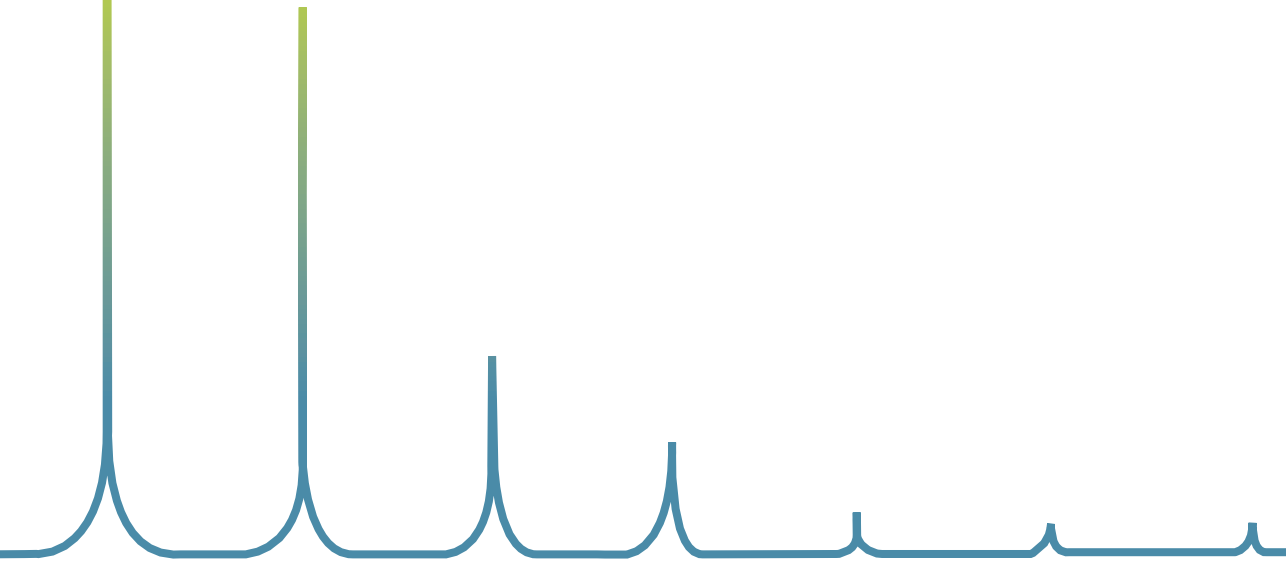
CHAPTER 7

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum vitae

Acknowledgements



Nederlandse samenvatting

Bacteriële infectie en antibioticaresistentie

De ontdekking van antibiotica in de 20e eeuw heeft de strijd tegen infectieziekten volledig getransformeerd. De decennia na de Tweede Wereldoorlog worden gekenmerkt door een wapenwedloop tussen de introductie van nieuwe klassen van antibiotica en de daaropvolgende ontwikkeling en verspreiding van resistentie. Inmiddels is antibioticaresistentie een wijdverspreid probleem. In sommige gevallen is er zelfs sprake van zeer resistent micro-organismen (highly resistant microorganisms, HRMOs), waarbij in het geval van een infectie bij een patiënt de behandelopties zeer beperkt zijn. Niet alleen is de aanwezigheid van resistente bacteriën een risico voor de patiënt zelf, tevens kunnen de resistente bacteriën zich ook naar andere individuen verspreiden.

Er is een breed scala aan antibiotica dat gebruikt wordt voor de behandeling van bacteriële infecties. De antibiotica zijn op verschillende manieren te classificeren. Ten eerste wordt er onderscheid gemaakt op basis van de chemische structuur van het antibioticum zoals bijvoorbeeld beta-lactam antibiotica, aminoglycosiden, glycopeptiden en fluoroquinolonen. Ten tweede wordt er onderscheid gemaakt in de specificiteit van een antibioticum, dat wil zeggen of deze slechts tegen één of enkele soorten effectief is (nauw spectrum) of juist een grotere groep (wijd spectrum). Het behoeft geen betoog dat het juist identificeren van de bacteriële verwekker en het bijbehorende resistentieprofiel cruciaal zijn bij het succesvol bestrijden van infecties en het voorkomen van verdere verspreiding van resistente bacteriën.

Eiwit identificatie als analyse methode voor het vaststellen van antibioticaresistentie

Het antibioticaresistentie profiel van een bacterie is belangrijk voor het bepalen van de behandelingsstrategie. Fenotypische testen zijn hiervoor nog altijd de gouden standaard. De grenswaarde in milligram per liter waarbij een antibioticum de bacteriële groei tegengaat bepaalt of een middel gebruikt kan worden voor de behandeling van patiënten met een infectie. De minimale inhiberende concentratie (MIC, minimum inhibitory concentration) is de laagste concentratie waarbij een antibioticum effectief is. Centrale instanties zoals de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) maken richtlijnen die worden gebruikt om deze MICs te bepalen en de data te interpreteren. Deze fenotypische bepalingen voorspellen of een micro-organisme resistent is, maar geven in het algemeen geen inzicht in de onderliggende mechanismen die deze resistentie veroorzaken.

Er zijn meerdere manieren waarop een micro-organisme resistent kan worden. Dit kan door de netto opname van antimicrobiële stoffen te verlagen door opname te verlagen of uitscheiding te verhogen. Hierbij spelen o.a. porines en efflux pompen een belangrijke rol. Een andere mogelijkheid is het onschadelijk maken van de stof zelf, bijvoorbeeld door het

te modificeren of af te breken. Bekende voorbeelden hiervan zijn enzymen die beta-lactam verbindingen kunnen hydrolyseren (beta-lactamases, carbapenemases) en aminoglycoside modificerende eiwitten. Er is inmiddels een groot scala aan moleculaire methoden, voornamelijk PCR, die de aanwezigheid van deze resistentiegenen kunnen bepalen. In dit proefschrift hebben we echter gekeken of we met behulp van proteomics analyses met behulp van massaspectrometrie, de aanwezigheid van de corresponderende eiwitten snel en accuraat konden aantonen. Hierbij hebben we gekozen voor een strategie, bottom-up proteomics, waarbij eiwitten in eerste instantie worden opgeknipt tot kleinere peptiden met behulp van het enzym trypsine, waarna de peptiden met de massaspectrometer worden geanalyseerd. Met behulp van zoekalgoritmes worden de verkregen spectra gezocht tegen databases om tot peptide/eiwit identificaties te komen. Proteomics is inmiddels niet meer weg te denken in het biomedisch onderzoek. Het gebruiken van deze techniek voor diagnostiek van antibioticaresistentie is echter niet grondig verkend. In hoofdstuk 2 geven wij de eerste aanzet voor een mogelijk platform voor de directe identificatie van carbapenemases in Gram-negatieve bacteriën. Carbapenems worden in de meeste gevallen ingezet als een middel voor de behandeling van infecties met multiresistente bacteriën. Onze hypothese was dat carbapenem resistentie kan worden aangetoond door het direct identificeren van carbapenemases. Hiervoor hebben we een methode gebruikt waarbij capillaire elektroforese gekoppeld is gekoppeld aan massa spectrometrie (CE-MS). Naast de hoge scheidingscapaciteit van capillaire elektroforese is het voordeel van deze scheidingstechniek ook zeer geschikt is voor hydrofiele peptiden. Na optimalisatie is de uiteindelijke methode getest met een set ($n = 27$) van klinische carbapenem resistente isolaten en een aantal negatieve controles. Deze resistente isolaten bestonden uit een groep de oxacillinase-48 (OXA-48) achtige ($n = 17$) en *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases (KPC, $n = 10$). Ter vergelijking werden er ook een fenotypische- en een PCR analyse uitgevoerd. In alle carbapenem-resistente isolaten konden we met CE-MS het carbapenemase aantonen. De methode werkte ook goed om een enkele bacteriekolonie. De identificaties kwamen volledig overeen met fenotypische en PCR gebaseerde karakterisering van de carbapenemases. De OXA-48 carbapenemases staan bekend als fenotypisch lastig te bepalen carbapenemases omdat ze het carbapenem langzaam omzetten. Naast de verwachte carbapenemases waren er ook meerdere extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) gevonden. Dit toont aan dat de methode ook breder ingezet kan worden voor de evaluatie van meerdere typen antibioticaresistentie.

Het succesvol aantonen van carbapenemases in diverse Gram-negatieve klinische isolaten vormde de basis voor een breder proteomics platform. Resistentie tegen derde generatie cefalosporines middels extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) is een veel voorkomende antibioticaresistentie. In hoofdstuk 3 hebben we een methode ontwikkeld voor de analyse van ESBLs direct in positieve bloedkweken. Vanuit een proteomics oogpunt heeft een bloedkweekfles een complexere matrix dan een voedingsbodem

of bouillonkweek. Dit stelt hogere eisen aan de monstervoorbewerking en de algehele robuustheid van de analyse methode. Voor dit onderzoek hebben we gebruik gemaakt van een andere scheidingsmethode, namelijk vloeistof-chromatografie (liquid chromatography, LC) gekoppeld met massaspectrometrie. Na meerdere opties onderzocht te hebben, is er gekozen voor een eenvoudige voorbewerking (gebruikmakend van saponine), waarbij de extracten werden verwerkt tot peptide mengsels die geanalyseerd werden met LC-MS/MS. Behalve de hogere robuustheid zou deze methode gevoeliger zijn omdat met deze methode er een grotere hoeveelheid monster geanalyseerd kan worden vergeleken met CE. Met deze nieuwe methode is er een prospectieve studie in twee academische centra opgezet, waarbij gedurende vier maanden alle positieve bloedkweken (n = 170) met *Escherichia coli* (n = 125) of *Klebsiella pneumoniae* (n = 45) verzameld werden. Van deze 170 kweken bleken er 22 ESBL positieve isolaten op basis van fenotypische analyse. Deze ESBL positieve bloedkweken zijn samen met 44 willekeurig geselecteerde negatieve controles (bloedkweken met niet-ESBL producerende bacteriën) geanalyseerd met LC-MS/MS. Van de gekweekte isolaten is ook een PCR analyse voor relevante ESBLs uitgevoerd. Met behulp van LC-MS/MS zijn de aanwezige ESBLs correct geïdentificeerd in 95 % van de bloedkweken, zonder vals positieve resultaten in de negatieve controles. Voor de familie van CTX-M ESBLs, welke 95% van de aanwezige ESBLs betrof, was er in alle gevallen een juiste identificatie en er kon ook onderscheid tussen groep 1 en groep 9 CTX-M gemaakt worden. Tijdens de studie zijn er geen carbapenemases aangetroffen. Resumerend toont de studie de geschiktheid van een proteomics platform voor vroege herkenning van ESBL producerende Gram-negatieve bacteriën in positieve bloedkweken.

Het identificeren en typeren van bacteriën op basis van het proteoom

Identificatie van bacteriën wordt traditioneel uitgevoerd door middel van Gram-kleuring, kweekmethoden en biochemische analyses. Meer recent gebeurt dit door eiwitanalyse met behulp van matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) massaspectrometrie (MS). Met behulp van deze techniek kan een profiel van eiwitten/peptiden bepaald worden dat karakteristiek is voor de aanwezige bacteriesoort. Het voordeel ten opzichte van de traditionele methoden is dat de analysemethode relatief eenvoudig en goedkoop is, waardoor het minder tijd vereist en sneller is. Dit heeft erin geresulteerd dat binnen enkele jaren MALDI-TOF MS instrumenten op vrijwel alle microbiologische laboratoria geïntroduceerd zijn.

Voor het onderzoeken van de verwantschap van bacteriën binnen een soort, en het herkennen van hypervirulente typen, zijn er een aantal typeringstechnieken beschikbaar. Deze technieken worden ook gebruikt bij een uitbraak om verspreiding vast te stellen en een mogelijke bron te ontdekken. Typering kan op basis van een fenotypische eigenschap zoals bijvoorbeeld antibioticaresistentie of op basis van genetische informatie (genotypering). Het ontbreekt momenteel echter aan een eenvoudige techniek met voldoende onderscheidend

vermogen die typering op een korte tijdschaal toestaat. De gebruikelijke moleculaire typeringsmethoden (bijvoorbeeld met PCR-ribotypering, whole genome MultiLocus Sequence Typing (wgMLST)) of core-genome MLST (cgMLST) zijn veelal traag, kostbaar en vereisen een complexe data analyse. Er zijn meerdere pogingen gedaan om eiwit profielen die gebruikt worden voor de identificatie van bacteriesoorten in te zetten voor typering. Hoewel meerdere studies claimen dat MALDI-TOF MS gebruikt kan worden voor de typering van diverse soorten Gram-negatieve bacteriën, zijn deze studies moeilijk te reproduceren in andere laboratoria. MALDI-TOF MS als een platform is niet krachtig genoeg en heeft een gebrek aan onderscheidend vermogen om robuuste typering te faciliteren. Er is echter een alternatieve analysemethode die met dezelfde simpele voorbereiding en op dezelfde tijdschaal hoogwaardigere data genereert die mogelijk voor typering gebruikt kan worden. Deze techniek gebruikt dezelfde ionisatie methode (MALDI), gekoppeld aan een hoge resolutie analyse te weten Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR). In hoofdstuk 4 hebben wij deze methode geoptimaliseerd en getest op toepasbaarheid voor de typering van *Pseudomonas aeruginosa* stammen. Hiervoor is een set van 18 klinische isolaten uit verschillende ziekenhuizen gebruikt. Met behulp van MALDI-FTICR was het mogelijk om hierin drie clusters te onderscheiden. Onafhankelijke moleculaire en fenotypische analyse bevestigden dat deze set uit drie clusters bestond. In één van de drie clusters vonden we resistentie tegen het antibioticum ciprofloxacin. Kortom, de studie toonde aan dat MALDI-FTICR MS snelle typering van bacteriën mogelijk maakt. Verdere ontwikkeling zal moeten resulteren in een robuustere methode en de verwachting is dat de methode met minimale aanpassingen toepasbaar is voor een verscheidenheid aan bacteriesoorten. Aangezien de aanschaf- en gebruikskosten voor dit apparaat vele malen hoger zijn, zijn deze instrumenten echter nog lang niet overal beschikbaar.

Proteomics als discovery tool voor nieuwe resistentiefactoren

Naast het identificeren van bekende eiwitten die resistentie kunnen veroorzaken is proteomics ook zeer geschikt voor onderzoek naar nieuwe resistentiefactoren. In hoofdstuk 5 is een studie uitgevoerd waarbij een carbapenem (meropenem) gevoelige en resistente stam van *Achromobacter xylosoxidans* met elkaar zijn vergeleken. Deze klinische isolaten waren afkomstig van een patiënt waarbij in een zeer korte tijd, tijdens de behandeling met meropenem, resistentie was ontstaan. Om het onderliggende mechanisme uit te zoeken is in eerste instantie een vergelijkende semi-kwantitatieve proteomics analyse uitgevoerd. Hieruit bleek dat één eiwit, dat wij Axc hebben genoemd, veel aanwezig was in de resistente stam maar niet in de gevoelige stam. Dit eiwit stond geannoteerd als klasse A beta-lactamase op basis waarvan de carbapenemase onduidelijk was. Om de carbapenemase activiteit van Axc te onderzoeken is het recombinant tot expressie gebracht in *E. coli*. Met behulp van fenotypische testen konden we op die manier laten zien dat deze cellen inderdaad hoger MICs voor imipenem en meropenem hadden. Vervolgens konden we met behulp van een colorimetrische assay en ¹H-NMR direct Axc-gemedieerde hydrolyse van imipenem

aantonen. Opvallend genoeg toonden moleculaire tests aan dat het *axc*-gen in beide *A. xylosoxidans* stammen identiek was. Daarnaast bleek na whole genome sequencen dat beide stammen, op één single nucleotide polymorphism na, genetisch identiek waren. Dit polymorfisme werd gevonden in een repressor waarvan door andere onderzoekers in een eerder stadium is aangetoond dat de aminozuurverandering die we in de resistente stam vonden, de activiteit van de repressor verlaagt. Kortom, op basis van onze studie konden we de nieuwe hypothese opstellen dat deze repressor ook de expressie van *axc* reguleert. In het algemeen bleek onze studie een mooi voorbeeld van de unieke mogelijkheden van proteomics, omdat de rol van *Axc* in de resistentie tegen meropenem niet zou zijn gevonden als alleen whole genome sequencing zou zijn uitgevoerd.

Perspectief

Het onderzoek zoals beschreven in dit proefschrift laat zien dat er naast de MALDI-TOF MS, dat reeds algemeen geaccepteerd, vele andere massaspectrometrische analyses van eiwitten mogelijk zijn die meer specifieke informatie kunnen verschaffen die interessant zijn voor de klinische microbiologische diagnostiek. Deze methoden kunnen niet alleen essentieel zijn voor onderzoek aan nieuwe resistentiefactoren, zoals onze studie aan *A. xylosoxidans* aantoont, maar mogelijk ook in de richting van diagnostische platforms voor typering en bepaling van resistentie, waarvoor we hier een aanzet hebben gegeven. Echter, verdere ontwikkelingen met betrekking tot de robuustheid en gebruikersvriendelijkheid van deze platforms zijn nodig voordat ze ook wat dit betreft dezelfde standaard als MALDI-TOF MS zouden kunnen worden.