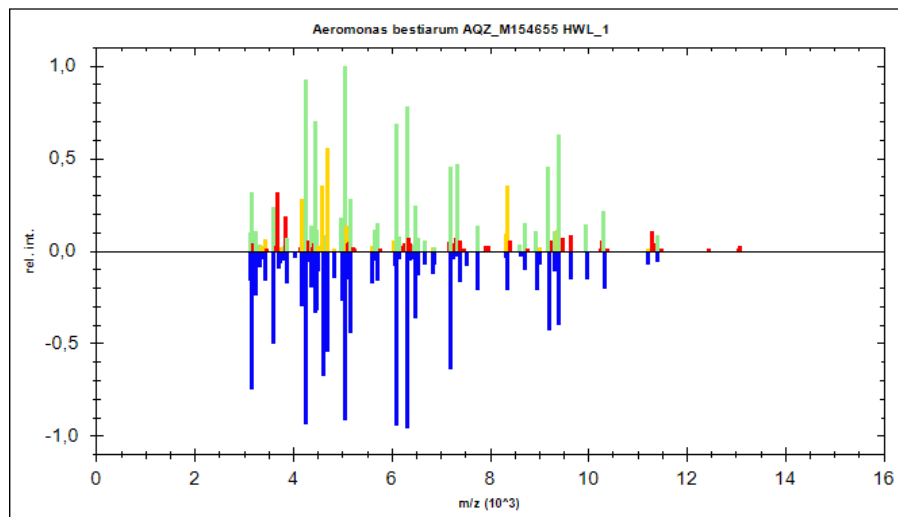


# DPWE Managementsamenvatting

## MALDI-TOF MS geschikt voor identificatie van *Aeromonas* in de routinematige kweekanalyse

**Auteurs** Maja Taucer-Kapteijn (HWL), Sander Dijkstra (HWL) en Leo Heijnen (KWR)







MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry) is geschikt om snel kolonies van *Aeromonas* te identificeren. Dat bleek al uit vergelijkend onderzoek (2017) waarbij 71 praktijkstammen (DPWE) en 14 referentie stammen van verschillende *Aeromonas*-soorten zijn geïdentificeerd met de MALDI-TOF en met sequentieanalyses (gyrB gen en rpoB gen). Voor de praktijkstammen kwamen de MALDI-TOF resultaten in 83% van de isolaten overeen met de resultaten van de sequentieanalyse. Voor de soorten *A. media*, *A. bestiarum* en *A. salmonicida*, die in drinkwater worden aangetroffen, was een verbetering van de identificatie betrouwbaarheid (d.m.v. uitbreiding van de database) mogelijk. Dat is in het vervolg onderzoek (2018) bereikt. De uitgebreide database is vervolgens getest met 133 praktijkstammen afkomstig van Waternet. Een selectie van deze stammen is ook geïdentificeerd met behulp van gyrB gen en rpoB gen sequensing. Hierbij kwam de identificatie voor 100% overeen met die van de MALDI-TOF. De uitbreiding van de MALDI-TOF heeft geleid tot een hogere betrouwbaarheid van de identificatie van *Aeromonas* geïsoleerd uit water. De nieuwe database is ook bij Aqualab Zuid beschikbaar gesteld.



Figuur 1. Voorbeeld van een MALDI-TOF identificatie op basis van de match tussen de gemeten massaspectra en massaspectra in de database (zie Tabel 1 voor scores).

Trefwoorden: identificatie *Aeromonas* spp., MALDI-TOF MS, gyrB, rpoB.

Tabel 1. MALDI-TOF identificatie scores.

Detected Species	Log(Score)
 <i>Aeromonas bestiarum</i> AQZ M154655 HWL 1	2,480
 <i>Aeromonas bestiarum</i> KWR M154624 3 HWL 2b	2,470
 <i>Aeromonas bestiarum</i> AQZ M154655 HWL 2	2,400
 <i>Aeromonas bestiarum</i> HWL M152771 HWL 2b	2,400
 <i>Aeromonas bestiarum</i> HWL M152758 HWL 1	2,390
 <i>Aeromonas bestiarum</i> KWR M154624 3 HWL 1	2,390
 <i>Aeromonas bestiarum</i> HWL M152771 HWL 2a	2,360
 <i>Aeromonas bestiarum</i> HWL M152758 HWL 2	2,350

### Belang: betrouwbare en snelle routinematige identificatie van *Aeromonas*

Het gebruik van MALDI-TOF als een betrouwbare en snelle/routinematige soortidentificatie van *Aeromonas* isolaten uit water werd getest. Door de uitbreiding van de MALDI-TOF database is de betrouwbaarheid van de identificatie van *Aeromonas* geïsoleerd uit water toegenomen.

### Aanpak: vergelijkend onderzoek tussen identificatie met MALDI-TOF en sequentieanalyse

Identificatie met behulp van de MALDI-TOF en identificatie met sequentieanalyses (rpoB en gyrB gen) zijn vergeleken voor een selectie van referentie- en praktijkstammen van *Aeromonas* spp. geïsoleerd uit drinkwater (DPWE). Uit onderzoek in 2017 is gebleken dat MALDI-TOF identificaties van de praktijkstammen in 83% overeenkwamen met de sequentie analyse. Sommige soorten, die in proces- of drinkwater voorkomen (*A. rivuli*), waren niet of met onvoldoende aantal stammen vertegenwoordigd in de MALDI-TOF-database. Betrouwbaar geïdentificeerde praktijkstammen (rpoB en gyrB gen) van *A. media*, *A. bestiarum* en *A. hydrophila*, *A. salmonicida* en *A. veronii* en één referentiestam van *A. hydrophila* zijn toegevoegd aan de MALDI-TOF database. Van *A. aquariorum* en *A. rivuli* waren in 2017 al referentiestammen toegevoegd aan de database. De uitgebreide database is opnieuw getest op een aantal praktijkstammen uit de distributie (Waternet).

### Resultaten: MALDI-TOF kan worden ingezet voor de identificatie van de *Aeromonas*-soorten in drinkwater

Voor uitbreiding database: De identificatie van de 71 geselecteerde praktijkstammen met MALDI-TOF en sequentieanalyse kwam in 83% van de gevallen overeen. Voor alle geanalyseerde stammen van *A. veronii*, *A. rivuli* en *A. sobria* kwamen de resultaten van MALDI-TOF volledig overeen met de sequentieanalyses. Alle stammen die volgens de sequentieanalyses tot *A. media* behoorden, zijn met de MALDI-TOF echter als *A. veronii* geïdentificeerd. Bij

de soort *A. bestiarum* was de herhaalbaarheid van de MALDI-TOF identificaties onvoldoende; de verschillende identificaties (met een betrouwbare score; >2.0) leverde in de meeste identificaties een andere soortnaam op, *A. eucrenophila* of *A. salmonicida* (>2.0). Met uitzondering van *A. allosacharophilla* (DSM stam staat onder *A. veronii* in de database) en *A. salmonicida* (identificatie was *A. eucrenophila*), kwamen de resultaten van de MALDI-TOF overeen met de soortnamen van de referentie stammen (DSM). De referentiestam van *A. jandaei* kon met de sequentieanalyses niet worden geïdentificeerd, wel met de MALDI-TOF.

Om de betrouwbaarheid van de identificatie van deze soorten te vergroten is het vervolgonderzoek uitgevoerd waarbij de MALDI-TOF database uitgebreid werd met de massaspectra van *A. media* (n=8), *A. hydrophila* (n=5), *A. veroni* (n=3), *A. salmonicida* (n=4), *A. bestiarum* (n=9) en *A. aquariorum* (n=2; in 2017) en *A. rivuli* (n=2; in 2017).

Na uitbreiding database: De identificatie van de 71 geselecteerde praktijkstammen met MALDI-TOF en sequentieanalyse kwam in 98,6% (70 van de 71) van de gevallen overeen. Ook na de uitbreiding van de MALDI-TOF database kan *A. aquariorum* als *A. hydrophila* worden geïdentificeerd. Dit geldt ook bij sequensen van *A. aquariorum*. Op basis van het literatuuronderzoek is bekend dat *A. aquariorum* vroeger tot *A. hydrophila* behoorde en aannemelijk is dat deze erg op elkaar lijken.

Na de uitbreiding van de database zijn 133 stammen geïsoleerd uit distributienet van Waternet. Deze zijn geïdentificeerd met de MALDI-TOF en een selectie daarvan (n=21) ook met de sequentie analyse (gyrB gen en rpoB gen). De resultaten laten zien dat voor 20 stammen de identificaties overeenkwamen. *A. jandaei* kon niet worden geïdentificeerd met sequensen.

Per locatie kwamen verschillende *Aeromonas* soorten voor. Zie Tabel 2. In totaal zijn er vijf soorten

gevonden (*A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. media*, *A. sobria* en *A. jandaei*). Uit deze beperkte dataset lijkt de diversiteit van de *Aeromonas* soorten door de zuivering af te nemen. *A. veronii*, en *A. bestiarum* zijn de meest vertegenwoordigde soorten na de langzame zandfiltratie en in drinkwater af pompstation.

Uit onderzoek waarbij verschillende voedingsbodems zijn gebruikt (TSA, LLA en ADA) blijkt, dat de betrouwbaarheid van de identificatie van *Aeromonas* daar gevoelig voor kan zijn (betrouwbaarheidsscore varieert). Daarom is het advies voor de identificatie van de *Aeromonas* geïsoleerd uit water ADA (standaard) medium te gebruiken.

#### Toepassing: betrouwbare en snelle routinematige identificatie van *Aeromonas*

De MALDI-TOF kan worden gebruikt voor de snelle identificatie van *Aeromonas* isolaten die in het routinematig onderzoek worden gevonden op ADA medium. Ook kan de MALDI-TOF worden ingezet als tool om de herkomst en de dynamiek van *Aeromonas* soorten in het drinkwaterproductieproces te onderzoeken of *Aeromonas* op verschillende plekken in de distributie te monitoren op soort niveau.

#### Rapport

De resultaten van dit DPWE 2017/2018 worden gerapporteerd in een publicatie (HWL/KWR, 2019). De begeleidingsgroep bij dit DPWE-project: Eveline Spierenburg-Sack (Evides), Herman Smit (PWN), Leon Kors (Waternet), Ed van der Mark (Dunea), Edwin Kardinaal, Eric Penders (HWL) en Jan Kroesbergen (HWL).

Tabel 2. MALDI-TOF identificatie van *Aeromonas* gevonden bij verschillende locaties Waternet.

Bemonstering 1	<i>A. veronii</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. media</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. jandaei</i>
PWK-KF-INF001	x		x	x	
PWK-VKF-001		x		x	x
PWK-VKF-003	x		x		
PWK-VLZF-001	x	x			
PWK-VLZF-002	x	x			
PWK-PO-001	x	x			
PWK-PO-002	x	x			
DAM-DN-053	x	x	x		
<b>Bemonstering 2</b>					
PWK-KF-INF001	x	x	x	x	
PWK-VKF-001	x	x	x		
PWK-VKF-003	x	x	x	x	
PWK-VLZF-001	x	x			
PWK-VLZF-002		x			
PWK-PO-001	x	x			
PWK-PO-002	x	x			

Jaar van publicatie  
2019

#### Meer informatie

dr. Maja Taucer-Kapteijn  
T (023) 517 59 00  
E [maja.taucer@hetwaterlaboratorium.nl](mailto:maja.taucer@hetwaterlaboratorium.nl)

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
F +31 (0)30 60 61 165  
E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)  
I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)



KWR | Mei 2019 © KWR

Watercycle  
Research  
Institute

Jaar van publicatie  
2019

**Meer informatie**

dr. Maja Taucer-Kapteijn

T (023) 517 59 00

E [maja.taucer@hetwaterlaboratorium.nl](mailto:maja.taucer@hetwaterlaboratorium.nl)

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

F +31 (0)30 60 61 165

E [info@kwrwater.nl](mailto:info@kwrwater.nl)

I [www.kwrwater.nl](http://www.kwrwater.nl)



Watercycle  
Research  
Institute

KWR | Mei 2019 © KWR