

Nieuwe labtechniek: FTIR-clusteranalyse

Om de juiste strategie te bepalen voor het bestrijden van een bacteriële ziekteverwekker, is alleen het aantonen van een bacterie vaak onvoldoende. Het blijkt steeds vaker nodig specifieke kenmerken van de betreffende ziekteverwekker te bepalen. Ons lab heeft een nieuwe techniek beschikbaar: Fourier-transform infrarood (FTIR)-

spectroscopie. Met specifieke software kunnen de infraroodspectra van verschillende isolaten van dezelfde bacteriesoort onderling met elkaar worden vergeleken en op basis daarvan in verschillende clusters worden ingedeeld. Dit ondersteunt het maken van een gefundeerde keus in de bestrijding van de ziekteverwekker.



Atomen in chemische bindingen bewegen continu ten opzichte van elkaar. Met FTIR-spectroscopie is het mogelijk deze intramoleculaire vibraties te meten. En net zoals gekleurde stoffen licht absorberen, zijn chemische bindingen door hun trillingen in staat om frequenties infrarood licht te absorberen. De hoeveelheid licht die van elke frequentie wordt geabsorbeerd, is afhankelijk van de chemische samenstelling van de binding. Het infraroodspectrum van een bacterie weerspiegelt daarmee de biochemische samenstelling van de bacteriecel en kan als biochemische vingerafdruk worden beschouwd.

In de praktijk

FTIR-spectroscopie kan worden ingezet bij terugkerende problemen op een bedrijf, waarbij het waardevol is om te weten of het in de tijd telkens verwante stammen zijn die de problemen veroorzaken, of dat het telkens andere stammen zijn. Ook bij uitbraken kan het worden ingezet om de infectiebron op te sporen en transmissieroutes in kaart te brengen.

Van *Pasteurella multocida* is bekend dat er verschillende soorten verantwoordelijk kunnen zijn voor ziekte bij pluimvee. Uit eerder praktijkonderzoek werd bekend dat zelfs binnen één uitbraak meerdere soorten betrokken kunnen zijn. Verschillende soorten kunnen anders zijn in serotype en in beschermingstype. Binnen één uitbraak zou met de FTIR-clusteranalyse onderzocht kunnen worden of er meerdere soorten betrokken zijn. Bij een terugkerende uitbraak bij het volgende koppel zou met de FTIR-clusteranalyse onderzocht kunnen worden of het nodig is om het (auto)vaccin aan te passen.

Sneller en goedkoper

FTIR-spectroscopie is een snelle en relatief goedkope techniek. Bij het uitvoeren van deze techniek komt nog wel het nodige kijken. Annet Heuvelink werkt op onze R&D-afdeling als bacterio-

loog. “De moeilijkheid zit erin dat we een reïncultuur, een verzameling van micro-organismen die afstammen van één enkele cel, moeten maken onder omstandigheden die altijd gelijk zijn. Dit betekent dat er strakke grenzen gelden als je het hebt over de incubatietemperatuur en -tijd. Ook de voedingsbodem is een kritieke factor in het geheel. Je wilt immers een goede vergelijking kunnen doen. Niet alleen van isolaten die in dezelfde run worden getest, maar ook van nieuwe met eerder geteste isolaten. Het is belangrijk een database op te bouwen van spectra die onder exact dezelfde omstandigheden zijn gegenereerd. Behalve een gestandaardiseerde werkwijze voor het maken van een reïncultuur is nauwgezetheid vereist bij het maken van een suspensie van het koloniemateriaal en het aanbrengen op de zogenaamde targetplaat, die vervolgens het apparaat ingaat. De procedure vanaf het maken van een koloniesuspensie tot en met het genereren van een spectrum duurt enkele uren, waarna de spectra met behulp van specifieke software kunnen worden vergeleken om vervolgens een uitspraak te kunnen doen over onderlinge verwantschap.”

Toepassing van FTIR-spectroscopie voor het clusteren, het samenvoegen van elementen met vergelijkbare kenmerken, van bacteriën heeft veel potentie voor de veterinaire wereld. Sinds medio juni biedt GD FTIR-clusteranalyse aan voor een elftal bacteriesoorten. Met het op de markt komen van deze producten staat het onderzoek bij GD niet stil. Momenteel zijn we bezig met het opzetten en valideren van methoden voor clusteranalyse van nog meer bacteriesoorten. En ook wordt gewerkt aan modellen, gebruikmakend van zelflerende software, waarmee isolaten kunnen worden geclassificeerd naar bijvoorbeeld serotype op basis van verschillen in infraroodspectra. Op dit moment is de FTIR-clusteranalyse standaard inzetbaar voor *E. coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (vlekziekte), *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus* en *Salmonella* Typhimurium. Voor overige kiemen is de techniek projectmatig beschikbaar.

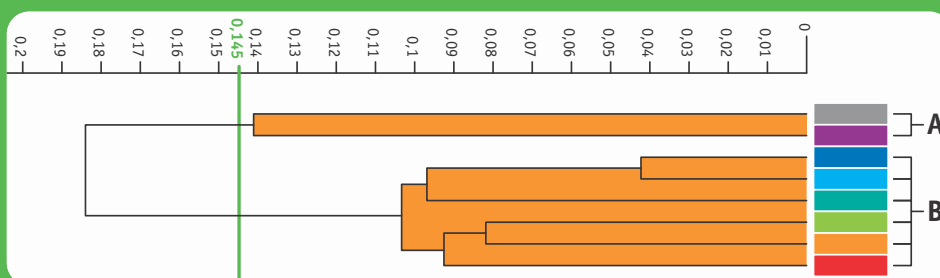
Voorbeeld praktische toepassing bij problemen door *Pasteurella multocida*

Op een pluimveebedrijf was in het vorige koppel ('A' in 2022) sprake van verhoogde uitval ten gevolge van *Pasteurella multocida*. Op basis van de *Pasteurella*-isolaten in koppel 'A' is het volgende koppel ('B') gevaccineerd in de opfok. Afgelopen jaar (2023) kampte

hetzelfde pluimveebedrijf opnieuw met een uitbraak van *Pasteurella multocida* in het huidige koppel ('B'). Met de FTIR-clusteranalyse zijn meerdere isolaten van dit pluimveebedrijf onderzocht.

De twee *Pasteurella*-isolaten van de uitbraak in 2022 (koppel 'A'), die verwerkt waren in het autovaccin, waren op basis

van het infraroodspectrum gelijk aan elkaar. Deze isolaten zijn vergeleken met zes bacterie-isolaten uit het huidige koppel ('B'). Deze zes isolaten waren op basis van het infraroodspectrum gelijk aan elkaar maar verschillend van de isolaten uit de eerdere uitbraak. Dit is terug te zien aan de aparte clusters die gevormd worden door 'A' en 'B' (zie afbeelding).



Dendrogram van de infraroodspectra van de geteste *Pasteurella multocida*-isolaten: de acht isolaten zijn in te delen in twee groepen, de isolaten uit 2023 ('B') clusteren met elkaar maar niet met 2022 ('A')