



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
W POZNANIU



WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
I NAUK O ZWIERZĘTACH

Potencjał MALDI-TOF w badaniach ichtiopatologicznych

Agnieszka Pękala-Safińska

Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Kaszubsko – Pomorska Konferencja Naukowa:

„One Health – zdrowie ludzi, zwierząt i środowiska – wspólna odpowiedzialność”

Gdańsk – Sobieszewo, 16-18.09.2026 r.



KONSPEKT PREZENTACJI

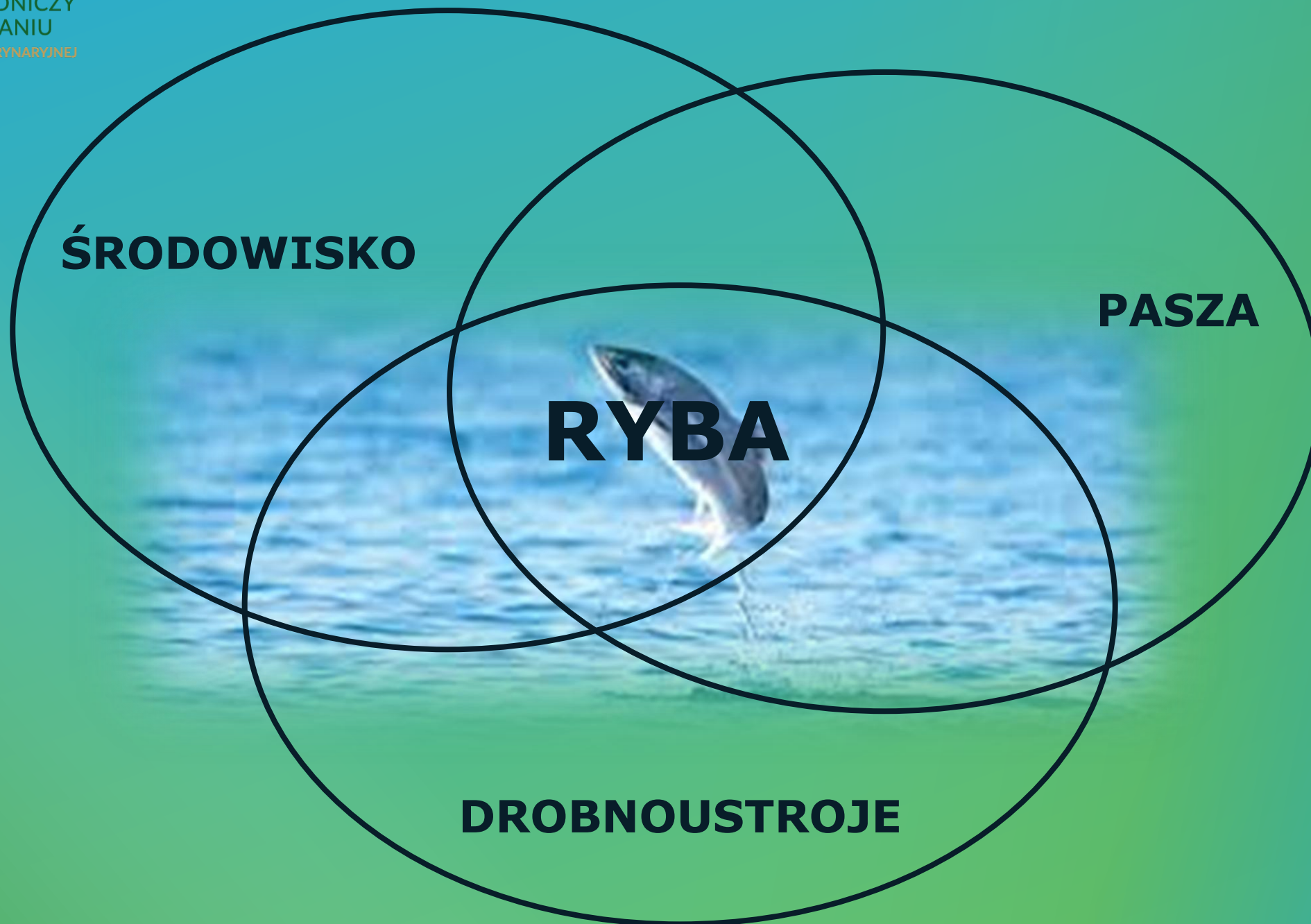
- **Ichtiopatologia – obszar aktywności**
- **Czynniki etiologiczne zaburzeń zdrowotnych ryb**
- **Możliwości diagnostyczne**
- **Wybór metody diagnostyki a prawidłowa identyfikacja patogenu**
- **Szybkość diagnostyczna = jakość?**

ICHTIOPATOLOGIA

- Diagnostyka chorób ryb
- Profilaktyka chorób ryb
- Terapia chorób ryb
- Nadzór nad chorobami zakaźnymi
- Bezpieczeństwo żywności - ryb



Wygenerowane przez AI



HODOWLA KARPI



HODOWLA PSTRĄGÓW



HODOWLA SADZOWA ŁOSOSIA



CHORE RYBY W HODOWLACH SADZOWYCH ŁOSOSIA







DIAGNOSTYKA CHOROÓB RYB

Wymaga dużego doświadczenia

- **Obserwacje zmian patologicznych**
- **Badanie bakteriologiczne**
- **Badanie parazytologiczne**
- **Badania wody - środowiska**
- **Badania wirusologiczne**
- **Badania z zastosowaniem biologii molekularnej**





BADANIE MIKROBIOLOGICZNE

BADANIE TOKSYKOLOGICZNE

Badanie
mykologiczne

Badanie
wirusologiczne

Badanie
bakteriologiczne



POPRAWKA do POLSKIEJ NORMY

ICS 07.100.20

PN-EN ISO 8199:2019-01/Ap1

Jakość wody

Ogólne wymagania i wytyczne dotyczące badania
mikroorganizmów metodą hodowli

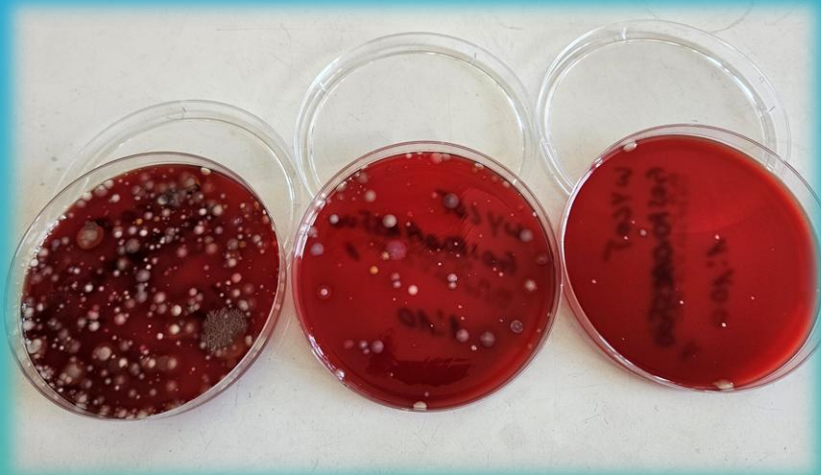
DIAGNOSTYKA CHOROÓB RYB

Brak znormalizowanych metod diagnostycznych

=

Trudności w diagnostyce





Posiew i izolacja bakterii



Identyfikacja fenotypowa i biochemiczna



Barwienie Grama



Testy biochemiczne

Identyfikacja materiału genetycznego patogenu



Izolacja
genomowego DNA



PCR

Testy biochemiczne

NEFERMtest 24 new

Ostateczna identyfikacja bakterii niefermentujących

- ostateczna identyfikacja klinicznie najważniejszych bakterii niefermentujących, bakterii z Vibrionaceae i Aeromonadaceae
 - wygodny zestaw bezodczynnikowy
 - bez użycia nośnika zawiesiny
 - 24 godzinna inkubacja w temp. 37°C
 - ocena: wizualna i za pomocą czytnika
 - bez dodatkowych testów
- Zestaw zawiera:**
 - paski do 40 identyfikacji
 - instrukcję obsługi z tabelą różnicującą
 - 10 PE torebek do inkubacji
 - 40 formularzy do zapisywania wyników
 - torebkę do przechowywania niezużytej płytki
 - pokrywę z nadrukiem
 - **NOWOŚĆ:** porównawczą skalę barw



Testy biochemiczne



API 20E
API 20 NE
API Zym
API Coryne
API Staph
API Staph

Instrukcja producenta:

inkubacja w 37°C przez 18 - 24 godzin

TYMCZASEM bakterie izolowane od ryb inkubuje się w temp. 22-25°C

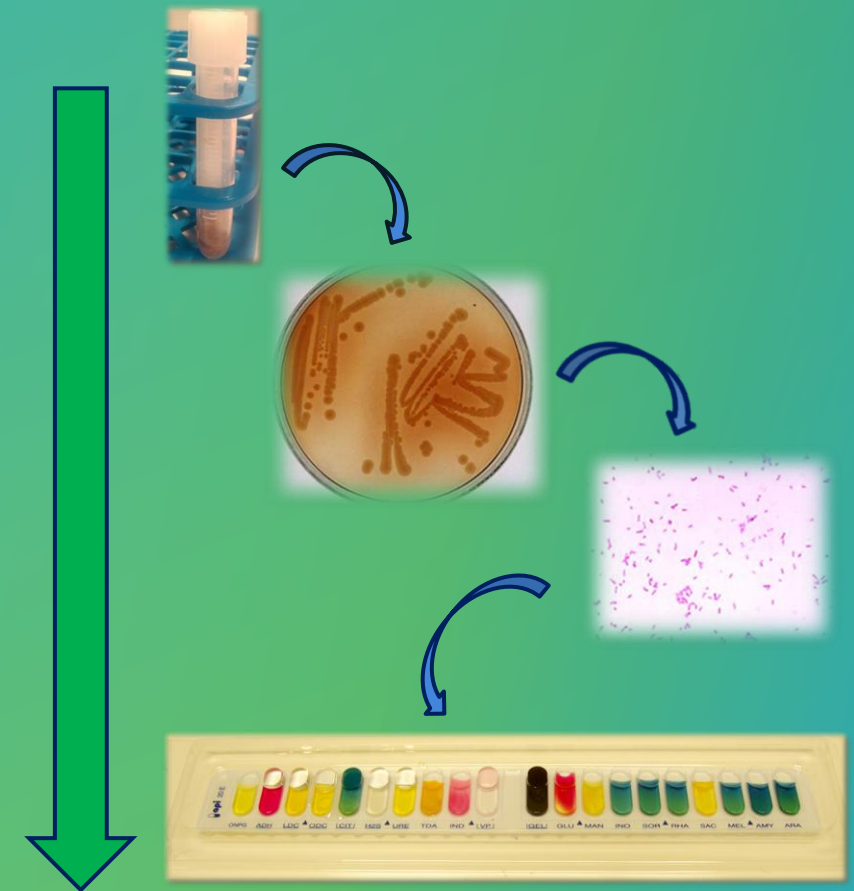
Testy biochemiczne



CZAS

Tok badania mikrobiologicznego

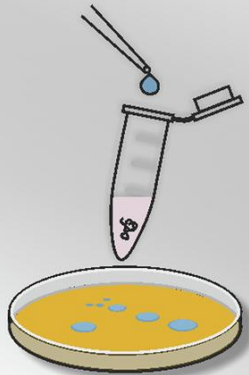
- Pobranie materiału od pacjenta
czas 0
- Hodowla na podłożach
bakteriologicznych
czas 48-72 h
- Reizolacja kolonii bakterii
czas 72-96 h
- Identyfikacja
czas 96-120 h
- Oznaczenie lekowrażliwości
czas 96-120 h



MALDI-Tof



1. Cultivation and preparation



Cultivation of bacteria on solid agar, sample preparation by tube based extraction, or by the smear method

2. MALDI-ToF MS



MALDI-ToF MS: measurements of bacterial/fungal isolates

3. Peak pattern matching



Peak list

2087.53
 2295.86
 2711.49
 2802.91
 3621.21
 3710.55
 4555.21
 5107.23
 5887.23
 6679.01
 6836.97

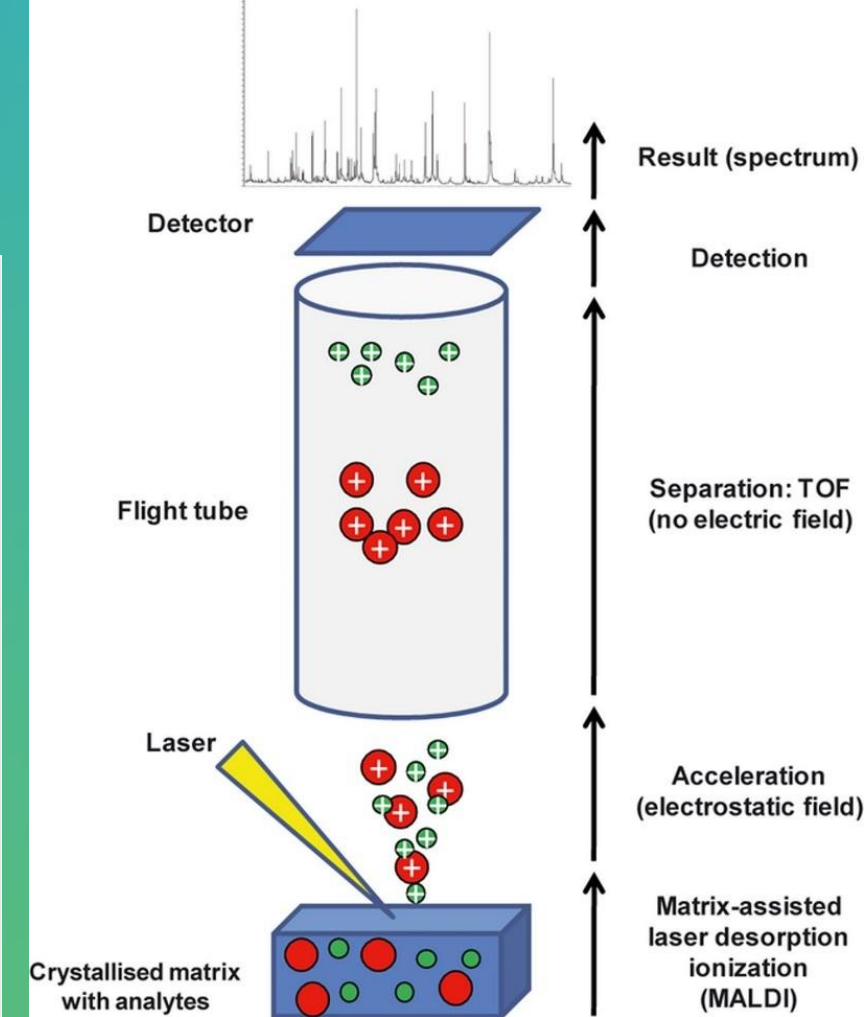
Matching of experimental peak list data with peak lists of reference strains

4. Identification analysis

Score ranking list

1. Strain A	2.567
2. Strain B	2.417
3. Strain C	2.131
4. Strain D	1.971
5. Strain E	1.876
6. Strain H	1.532
7. Strain I	1.531
8. Strain K	1.487
9. Strain L	1.212
...	

Microbial identification using score ranking lists



<https://cloverbiosoft.com/using-of-maldi-tof-in-hospitals/>



ZALETY SYSTEMU

Krótki czas identyfikacji

**METODY
BIOCHEMICZNE**

5 – 48 h

MALDI-TOF

3 – 5 min

Brak konieczności wykonania testów dodatkowych
Brak konieczności namnażania drobnoustroju
Wysokie prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji

<u>A19</u> (+++)(B)	Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida DT Ilona (standard)	<u>Aeromonas salmonicida</u>	<u>2.06</u>	<u>Aeromonas bestiarum</u>	<u>2.03</u>
<u>A20</u> (+++)(B)	Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida DT Ilona (standard)	<u>Aeromonas salmonicida</u>	<u>2.21</u>	<u>Aeromonas salmonicida</u>	<u>2.11</u>
<u>A21</u> (+)(B)	Shewanella algae DT Ilona (standard)	Shewanella algae	<u>1.98</u>	Shewanella putrefaciens	<u>1.95</u>
<u>A22</u> (+)(B)	Shewanella algae DT Ilona (standard)	Shewanella algae	<u>1.86</u>	Shewanella putrefaciens	<u>1.72</u>
<u>A23</u> (-)(C)	Shewanella putrefaciens DT Ilona (standard)	no peaks found	<u>0.00</u>	no peaks found	<u>0.00</u>
<u>A24</u> (+)(C)	Shewanella putrefaciens DT Ilona (standard)	Shewanella baltica	<u>1.88</u>	No Organism Identification Possible	<u>1.59</u>

Szczepy referencyjne	Sekwencjonowanie	MALDI TOF	Testy biochemiczne				
			API 20E	API 20NE	API 50CH	Vitek 2	Microbact
ATCC 7966 <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas media</i> (1.906 – 2.024)	<i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> 2 (55.4)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (60.8)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (99.7)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (95.1)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (73.1)
ATCC 14174 <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (1.998 - 2.056)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (91.0)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (98.6)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.9)	<i>Aeromonas salmonicida</i> (89.9)	<i>Pasteurella multocida</i> (72.2)
ATCC BAA 237 <i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas veronii</i> (1.989 – 2.041)	<i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> 1 (67.0)	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> (89.9)	<i>Aeromonas sobria</i> (98.4)	<i>Aeromonas sobria</i> (99.0)	<i>Aeromonas veronii</i> bt. <i>sobria</i> (56.5)
ATCC 53794 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> (2.153 – 2.205)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (54.9)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.7)	profil nie do zaakceptowania	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.5)	<i>Ps. fluorescens</i> (66.9)
ATCC BAA 1097 <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella baltica</i> / <i>profunda</i> (1.837 – 2.139)	<i>Sewanella putrefaciens</i> group (98.9)	<i>Sewanella putrefaciens</i> group (94.2)	profil nie do zaakceptowania	<i>Shewanella putrefaciens</i> (93.7)	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ssp. <i>xylosus</i> (75.4)
NCTC 12266 <i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> (1.985 – 2.025)	<i>Hafnia alvei</i> 2 (99.6)	nie badano	<i>Yersinia ruckeri</i> (99.9)	<i>Yersinia ruckeri</i> (67.3)	<i>Yersinia ruckeri</i> (92.4)
11/1503 <i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i> (2.34 - 2.044)	<i>Hafnia alvei</i> 1 (97.6)	nie badano	<i>Hafnia alvei</i> (99.9)	<i>Hafnia alvei</i> (89.3)	<i>Klebsiella ozaenae</i> (94.4)
11/1501 <i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (2.153 – 2.102)	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (94.1)	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (99.9)	profil nie do zaakceptowania	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (90.3)	<i>Bergeyella zoohelcum</i> (68.6)

API	Sekwencjonowanie	MALDI Tof
API 20 NE: bardzo dobra identyfikacja <i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas veronii</i>
API 20NE: profil nie do zaakceptowania <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas hydrophila</i>
API 20E: bardzo dobra identyfikacja <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>
API 20NE: doskonała identyfikacja do rodzaju <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
API 20NE: profil wątpliwy <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>

API	Sekwencjonowanie	MALDI ToF
API20E: niskie rozróżnienie Citrobacter youngae	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>
API 20E: niskie rozróżnienie <i>Pseudomonas oryzae</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
API 20 NE: dobra identyfikacja <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas</i> <i>rhizophila</i>	<i>Stenotrophomonas</i> <i>rhizophila</i>

API	Sekwencjonowanie	MALDI Tof
<i>Shewanella putrefaciens</i> group	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i> group	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella baltica</i>
API 20NE: dobra identyfikacja <i>Comamonas testosteroni</i> / <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
API 20E: profil wątpliwy <i>Vibrio mimicus</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
API 20E: doskonała identyfikacja do rodzaju <i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>

Sekwencjonowanie (porównanie ze bazą GenBank)	API 20E API 20 NE API 50 CH	Vitek 2 Microbat	Enterotest Nefermtest	MALDI TOF
<i>Aeromonas hydrophila</i> AB680394 (99.7 – 99.9)	<i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> 2 (65.3-68.4) <i>A. sobria</i> (92.0-99.9)/ <i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> (83.8-99.9) <i>A.hydrophila</i> (97.8-99.9)/ <i>A.sobria</i> (99.1)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (95-97)/ <i>A.sobria/veronii</i> (96) <i>A. hydrophila</i> (66.6-99.9)/ <i>A. caviae</i> (72.4)	<i>A.hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (67.9-75.5)/ <i>A.hydrophila</i> (66.5-71.0) <i>A.ichtiosmia</i> (79.0-89.0)/ <i>A.sobria</i> (88.2-92.5)/ <i>A. hydrophila</i> (66.5)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1.94-2.056)
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> HE979857 (100) AB680308 (100)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (99.3)/ <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.6) <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.6)/ <i>A.hydrophila</i> (99.9)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (95)/ <i>A.salmonicida</i> (94) <i>A. caviae</i> (92.8)/ <i>Pasteurella multocida</i> (72.2)	<i>A.caviae</i> (68.5-79.8) <i>A.ichtiosmia</i> (100)/ <i>A.sobria</i> (86.1)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (1.83-1.943)

Sekwencjonowanie (porównanie ze bazą GenBank)	API 20E API 20 NE API 50 CH	Vitek 2 Microbat	Enterotest Nefermtest	MALDI TOF
<i>Aeromonas sobria</i> JX393078 (99.9) KC213892 (100)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (81.2-93.8) <i>/A.hydrophila</i> (65.8) <i>A. hydrophila</i> (94.3-99.9)/ <i>A.sobria</i> (77.8)	<i>A.sobria</i> (93-98)/ <i>A.sobria/veronii</i> (94) <i>A.caviae</i> (79.4-96.6) <i>/A.veroni</i> bt. <i>sobria</i> (86.2)	<i>A.caviae</i> (81.8)/ <i>A. hydrophila</i> (76.0) <i>V.cholerae</i> (76.6)/ <i>V.metschnikovii</i> (43.0) <i>A.sobria</i> (89.5)/ <i>A.veronii</i> (61.6)/ <i>A.caviae</i> (29.62)/ <i>A.veronii</i> (86.0-89.5)	<i>Aeromonas sobria</i> (2.002-2.088) <i>Aeromonas hydrophila</i> (1.99-2.002)
<i>Aeromonas veronii</i> KC210782 (100) FJ653620 (99.79)	<i>A.sobria</i> (70.6 - 99.9)/ <i>A.hydrophila/caviae</i> (99.9)/ <i>Burkholderia cepacia</i> (52.5) <i>A.sobria</i> (98.4-99.9)/ <i>A.hydrophila</i> (93.5-99.9)	<i>A.sobria/veronii</i> (93-98)/ <i>A.hydrophila/caviae</i> (74.5-98) <i>A.veroni</i> bt. <i>sobria</i> (41.5-83.2)/ <i>A.caviae</i> (62.2-92.8)	<i>A.hydrophila</i> (66.5-89.5)/ <i>A.caviae</i> (89.5)/ <i>A.sobria</i> (69.5) <i>A.ichtiosmia</i> (34.2-84.0)/ <i>Pantoea stewartii</i> (46.6) <i>A.ichtiosmia</i> (98.0-100)/ <i>A.caviae</i> (22.0 - 78.1)/ <i>A. veronii</i> (63.0-95.1)	<i>Aeromonas veronii</i> (2.002-2.075) <i>Aeromonas media</i> (1.83)

Sekwencjonowanie (porównanie ze bazą GenBank)	API 20E API 20 NE API 50 CH	Vitek 2 Microbat	Enterotest Nefermtest	MALDI TOF
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JQ795779 (100) AY538263 (100)	<i>Ps. fluorescens</i> (95.7-99.9)/ <i>Ps.fluorescens/putida</i> (54.9) <i>Ps. fluorescens</i> (85.3-99.1)	<i>Ps. fluorescens</i> (42.1-67.5)/ <i>Ps. aeruginosa</i> (99.9) <i>Ps.fluorescens</i> (48.1)/ <i>Brevundimonas diminuta</i> (99.9)	<i>Ps. aeruginosa</i> (70.3) <i>Ps. fluorescens</i> (90.33)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2.001-2.102)
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> JP496527 (99.93) KP738611 (99.57)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> <i>Ps.alcaligenes</i> (90.0)	<i>Ps.aeruginosa</i> (95)	nie badano	nie badano
<i>Shewanella putrefaciens</i> KP987225 (99.62) JQ795824 (99.40)	<i>Bordetella/Alcaligenes /Moraxella</i> (43.1) <i>A.salmonicida subsp salmonicida</i> (66.1)/ <i>Sh.putrefaciens group</i> (98.9-99.3)	<i>Sh.putrefaciens</i> (95-99) <i>Alcaligenes xylosoxidans ss. xylos</i> (60.0-99.7)/ <i>V.alginolyticus</i> (50.6)	<i>Sh.putrefaciens group</i> (99.8)	<i>Sh.putrefaciens group</i> (99.8)

Sekwencjonowanie (porównanie ze bazą GenBank)	API 20E API 20 NE API 50 CH	Vitek 2 Microbat	Enterotest Nefermtest	MALDI TOF
<i>Yersinia ruckeri</i> AB681666 (99.93)	<i>Hafnia alvei</i> 2 (93.9)/ <i>V.mimicus</i> (84.2) <i>Y.ruckeri</i> (99.9)	<i>Y.ruckeri</i> (99) <i>Y.ruckeri</i> (92.4)/ <i>K.</i> <i>ozaenae</i> (52.08)	<i>Y.ruckeri</i> (67.66- 70.09)	<i>Y.ruckeri</i> (1.94-2.056)
<i>Chryseobacterium</i> <i>sp.</i> KP188538 (99.92) NR145657 (99.63)	<i>Ch. indologenes</i> (98,8)/ <i>Weeksella</i> <i>virosa</i> / <i>Empedobacter</i> <i>brevis</i> (96,6%)/ <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> (91,8) <i>Ch.indologenes</i> (99.9)	<i>Ch.indologenes</i> (95-99) <i>W.virosa</i> (69.6)	<i>Ch.indologenes</i> (58.0- 88.24)/ <i>W.virosa</i> (23.24)	Identyfikacja wątpliwa (1.33-1.603)
<i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides</i> KP899516 (99.93)	<i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides</i> (99.9) <i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides</i> (99.9)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (99.9)	nie badano	<i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides</i> (1.828-2.053)

PODSUMOWANIE

- Maldi ToF jest obiecującym narzędziem diagnostycznym
- Wyniki identyfikacji bakterii metodą sekwencjonowania oraz Maldi ToF są zgodne
- Ważne, aby w MALDI-TOF móc możliwość rozszerzenia widm badanych drobnoustrojów

Dziękuję za uwagę