

Identyfikacja bakteryjnych patogenów ryb metodą MALDI-TOF MS – aktualny stan wiedzy

MONIKA OLECH, EWA PAŹDZIOR

Zakład Chorób Ryb, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 26.01.2024

Zaakceptowano 22.03.2024

Olech M., Paździor E.

Detection of bacterial fish pathogens by MALDI-TOF MS – state of the art

Summary

A key element in the diagnosis of bacterial infections in fish is the rapid identification of the etiological agent of the disease and drug resistance testing. Traditional methods of identifying the bacteria that cause fish diseases are often slow and/or expensive. MALDI-TOF MS is a well-established, rapid, accurate and cost-effective method based on protein profile analysis for the identification of bacterial pathogens in human and veterinary laboratories, and has now found application in the diagnosis of bacterial infections in fish. The method identifies microorganisms based on their protein profile, which is then compared with reference spectra stored in databases. Since not all bacterial fish pathogens are included in commercial databases, libraries are usually created locally for the relevant reference strains/species. As studies have shown, MALDI-TOF MS is suitable for the specific identification of many bacterial fish pathogens enabling rapid diagnosis of infections.

Keywords: MALDI-TOF, mass spectrometry, bacterial fish pathogens

Zaburzenia zdrowotne u ryb mogą być wywołane przez szereg czynników środowiskowych, jak również patogeny, dlatego też wczesne wykrycie przyczyny choroby jest niezbędne, aby podjąć odpowiednie zabiegi hodowlane lub leczenie zanim dojdzie do dużych strat. Bakteryjne choroby ryb są częstym zjawiskiem i wywoływane są przez różne gatunki zarówno Gram-ujemne, jak również Gram-dodatnie. Klasyczne metody identyfikacji stosowane w diagnostyce patogenów ryb opierają się na hodowli bakterii oraz badaniu ich właściwości morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych. W pewnych przypadkach nie zapewniają one wiarygodnej odpowiedzi w rutynowej identyfikacji mikrobiologicznej, gdyż większość komercyjnych zestawów biochemicznych jest dedykowana do identyfikacji bakterii izolowanych od zwierząt stałocieplnych. Poza tym, techniki te są pracochłonne i czasochłonne, a niekiedy wymagają zastosowania wielu odczynników oraz zestawów diagnostycznych, co zwiększa koszty prowadzonych badań. Etapy hodowli i identyfikacji organizmu, od pobrania i przygotowania próbki do interpretacji wyników biochemicznych, zwykle trwają od 4 do 5 dni, a w przypadku patogenów wolno rosnących nawet kilka tygodni (5). Także techniki molekularne oparte na amplifikacji i sekwencjonowaniu DNA, które znajdują szerokie zastosowanie w laboratoriach dia-

gnostycznych, są czasochłonne i kosztowne. Trudności te można pokonać stosując metodę spektrometrii mas z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry). MALDI-TOF MS jest stosunkowo nową metodą stosowaną przez laboratoria mikrobiologiczne, służącą do identyfikacji drobnoustrojów. Za opracowanie tej metody Koichi Tanaka otrzymał w 2002 r. nagrodę Nobla w dziedzinie chemii (43). Metoda opiera się na analizie białek rybosomalnych, które w mikroorganizmach występują w dużych ilościach i są charakterystyczne dla poszczególnych rodzin, rodzajów i gatunków drobnoustrojów. Istnieją dwie główne metody przygotowania próbek, tj. metoda bezpośredniego transferu i metoda ekstrakcji białek. Pierwsza z nich jest łatwa, szybka i polega na przeniesieniu pojedynczej kolonii bakterii, z 18-24 h hodowli na podłożu stałym, na płytkę do analizy. Metoda ekstrakcji białek polega na ekstrakcji białek z komórek bakteryjnych przy użyciu różnego rodzaju rozpuszczalników (40) i jest zalecana, gdy wymagana jest wyższa jakość widm. Na komórki/białka naniesione na płytkę nanoszony jest roztwór matrycy absorbującej energię lasera. Najczęściej stosowaną matrycą jest kwas alfa-cyano-4-hydroksycynamonowy (CHCA)

rozpuszczony w standardowym rozpuszczalniku składającym się z acetonitrylu (50%) i kwasu trifluorooctowego (2,5%) w wodzie o czystości LC-MS. Tak przygotowana i osuszona płytka umieszczana jest w komorze analizatora. Na tym etapie pod wpływem działania lasera, w warunkach próżni, dochodzi do desorpcji (uwalniania) i jonizacji cząsteczek matrycy i białek bakteryjnych, a następnie rozdziału zjonizowanych białek na frakcje o różnej masie cząsteczkowej i ładunku. Wynik pomiaru rejestrowany jest w postaci charakterystycznych pików widma, które tworzą unikatowy profil białkowy badanego mikroorganizmu, tzw. molekularny „odcisk palca”. Profil ten jest następnie porównywany do profili wzorcowych różnych drobnoustrojów zebranych w bibliotece widm masowych (39). W wyniku tego porównania określany jest gatunek lub rodzaj badanego szczepu wraz z informacją o stopniu podobieństwa widma badanego drobnoustroju do widma referencyjnego. Ten stopień zgodności wyrażany jest w postaci tzw. wskaźnika mieszczącego się w zakresie od 0 do 3,000. Im wyższa wartość wskaźnika, tym wyższa wiarygodność identyfikacji badanego mikroorganizmu. Wartość wskaźnika ustalana jest na różnym poziomie w zależności od drobnoustroju. Według zaleceń firmy Bruker, wartość wskaźnika od 2,300 do 3,000 wskazuje na wiarygodną identyfikację do poziomu gatunku, wartość wskaźnika od 2,000 do 2,299 wskazuje na wiarygodną identyfikację do poziomu rodzaju i prawdopodobną identyfikację do gatunku, wartość wskaźnika od 1,700 do 1,999 wskazuje na prawdopodobną identyfikację do poziomu rodzaju, natomiast wartość wskaźnika poniżej 1,7 wskazuje na niewiarygodną identyfikację szczepu (www.bruker.com).

Ponieważ identyfikacja bakterii metodą MALDI-TOF MS opiera się na porównaniu widm mas nieznanymi mikroorganizmów z widmami zawartymi w referencyjnej bazie danych, metoda ta jest w stanie zidentyfikować tylko te gatunki bakterii, dla których w bazach danych znajdują się już wcześniej ustalone widma referencyjne. Obecnie na rynku znajduje się kilka systemów, jednak dominują dwa komercyjnie dostępne systemy do identyfikacji oparte na technologii MALDI-TOF MS: MALDI Biotyper firmy Bruker i VITEK MS firmy BioMerieux (30). MALDI Biotyper firmy Bruker jest zdecydowanie częściej stosowany i szerzej opisany w publikacjach naukowych. Podczas gdy technika MALDI-TOF MS została wprowadzona do laboratoriów diagnostycznych ryb w 2012 r., widma dla wielu bakteryjnych patogenów ryb nie były obecne w standardowych bazach danych dostarczanych przez firmy w tamtym czasie. W związku z tym istniała potrzeba rozszerzenia dostępnych baz danych MALDI-TOF MS o widma innych mikroorganizmów. Ponadto biblioteka firmy Bruker została opracowana przy użyciu gatunków bakterii wyizolowanych od ludzi, co mogło utrudniać wykorzystanie tej biblioteki referencyjnej do identyfikacji patogenów ryb (9).

Identyfikacja wybranych patogenów ryb metodą MALDI-TOF MS

W 2013 r. laboratorium z Wielkiej Brytanii (APHA) oraz krajowe laboratoria referencyjne ds. chorób ryb z Holandii (WBVR), Danii (DTU) i Szwecji (SVA) zainicjowały projekt mający na celu ulepszenie systemu MALDI-TOF MS do identyfikacji ważnych patogenów ryb, takich jak: *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Renibacterium salmoninarum*, *Vibrio anguillarum* i *Yersinia ruckeri*. Wstępne badania metodą MALDI-TOF MS wykazały brak profili dla *F. columnare*, *F. psychrophilum* i *R. salmoninarum* w bazie danych firmy Bruker, dlatego nowe profile widm dla tych bakterii zostały utworzone i wprowadzone do lokalnej bazy danych w oparciu o szczepy referencyjne. Umożliwiło to zidentyfikowanie wszystkich *F. psychrophilum*, *F. columnare*, *Ps. anguilliseptica*, *R. salmoninarum*, *V. anguillarum* i *Y. ruckeri* do poziomu gatunku za pomocą MALDI-TOF MS (17). Jednak pomimo tego, że widmo dla *V. anguillarum* było uwzględnione w bazie danych Bruker, badania wykonane przez Kazazić i wsp. wykazały, że MALDI-TOF MS był w stanie zidentyfikować tylko 73,85% izolatów *V. anguillarum* wyizolowanych od chorych ryb morskich do poziomu gatunku (21). Jak zasugerowali autorzy, to niepowodzenie w identyfikacji wszystkich izolatów *V. anguillarum* mogło wynikać z powodu stosowania różnych podłoży hodowlanych, czasu wzrostu oraz temperatury inkubacji. Autorzy wykazali bowiem, że w celu wiarygodnej identyfikacji szczepów *V. anguillarum*, MALDI-TOF MS powinien być wykonywany na szczepach hodowanych na agarze tryptonowo-sojowym (TSA) z dodatkiem NaCl w temperaturze od 15°C do 22°C, inkubowanych przez 48-72 godzin. Prawidłowa identyfikacja szczepów *V. anguillarum* zmniejszała się wraz z wydłużaniem czasu inkubacji w 37°C (18). Wstępne badania prowadzone przez Jansson i wsp. (17) potwierdziły, iż metoda MALDI-TOF MS po rozszerzeniu baz danych o profile widm wybranych bakterii ma zastosowanie w identyfikacji bakterii izolowanych od ryb.

Niektóre badania wykazały, że MALDI-TOF MS może skutecznie identyfikować gatunki *Aeromonas* przy użyciu bazy danych firmy Bruker (6, 8, 10, 27). Benagli i wsp. (3) wykazali, że dla większości analizowanych gatunków *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. media*, *A. tecta*, *A. popoffii*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. veronii* i *A. sobria*) identyfikacja metodą MALDI-TOF MS po wprowadzeniu nowych profili zakończyła się sukcesem. Jedynie identyfikacja *A. popoffii* była możliwa tylko w 46%. Jednak Jansson i wsp. (17) wykazali, że identyfikacja *A. salmonicida* do poziomu gatunku przy użyciu MALDI-TOF MS była dość trudna, ponieważ występowała fałszywie dodatnia identyfikacja ruchliwych gatunków *Aeromonas*

(„*A. bestiarum*”). Identyfikacja *A. salmonicida* do poziomu gatunku wymagała zatem dodatkowej analizy fenotypowej lub potwierdzenia w badaniach serologicznych oraz genotypowych w celu uzyskania prawidłowej identyfikacji. Pérez-Sancho i wsp. (32) wykazali 100% użyteczność MALDI-TOF MS do identyfikacji *Aeromonas* do poziomu rodzaju, ale nie do dokładnej identyfikacji gatunków. Wyniki pokazały bowiem, że 91% i 65,5% izolatów *A. hydrophila* i *A. salmonicida* zostało dokładnie zidentyfikowanych, podczas gdy większość izolatów *A. veronii*, *A. sobria* i *A. bestiarum* dała niejednoznaczne wyniki. Większość izolatów *A. popoffii* (8/13) została błędnie zidentyfikowana z różnymi gatunkami *Aeromonas*. Badania wykonane przez Pérez-Sancho i wsp. (32) wykazały także, że uzupełnienie biblioteki o nowe profile mas specyficzne dla różnych gatunków *Aeromonas* zwiększyło liczbę izolatów z dokładną identyfikacją z 41% do 55% i zmniejszyło liczbę izolatów z niejednoznaczną identyfikacją z 45% do 29%. Inne badania także potwierdziły, że identyfikacja mikroorganizmów przy użyciu biblioteki Bruker Biotyper nie jest najlepszym podejściem do dokładnej identyfikacji bakterii *Aeromonas* izolowanych od ryb (27, 33). Wykazano jednak, że specyficzne piki mas mogą być wykorzystane jako specyficzne biomarkery do identyfikacji i różnicowania gatunków *Aeromonas*. Szereg takich pików (4256, 4700, 5049, 6304 i 6480 m/z) znaleziono u wszystkich gatunków *Aeromonas*. Ponadto, niektóre specyficzne piki mas zaobserwowano tylko w widmach poszczególnych gatunków. Charakterystyczne dla gatunku piki zostały zidentyfikowane dla *A. hydrophila* i *A. bestiarum* (5003 i 7360 m/z w, odpowiednio, 95,5% i 94,1% izolatów). Dodatkowo piki 4460 i 4490, charakterystyczne dla gatunków *A. sobria* i *A. veronii* zostały wykryte, odpowiednio, u 65% izolatów (33). Badania przeprowadzone przez Fernández-Álvarez i wsp. (13) wykazały występowanie specyficznego dla gatunku piku przy m/z 2028.35 we wszystkich szczepach *A. salmonicida* oraz specyficznych pików dla podgatunku *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (2105.56, 3112.87, 3293.22, 3400.97, 4117.59, 5105.56, 6804.55 i 8884.05), *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (3011.77, 3372.66, 3762.02, 6747.92 i 9014.04) i *A. salmonicida* subsp. *smithia* (2461.93, 2920.31, 3082.85, 3435.62, 3739.54, 5930.05 i 7283.06).

Aby sprawdzić, czy MALDI-TOF MS jest w stanie rozróżnić różne gatunki *Pseudomonas* Kačániová i wsp. (20) przeanalizowali zestaw 27 szczepów pozyskanych od różnych gatunków ryb, a wyniki porównali z wynikami sekwencjonowania konserwatywnego genu 16S rRNA. W sumie 14 *Pseudomonas* spp. zostało zidentyfikowanych za pomocą MALDI-TOF MS, a tylko 6 z nich dało takie same wyniki, jak sekwencjonowanie. Świadczy to o tym, że rozdzielczość MALDI-TOF MS nie jest wystarczająco wysoka, aby rozróżnić wszystkie gatunki *Pseudomonas* izolowane od ryb.

Niektóre gatunki patogenów ryb z rodzaju *Flavobacterium* rosną wolno, co sprawia, że ich charakterystyka jest czasochłonna oraz wymaga zastosowania dodatkowych badań komplementarnych ze względu na ich słabą reakcję w standardowych testach (7), dlatego Strepparava i wsp. wykorzystali metodę MALDI-TOF MS do identyfikacji gatunków *Flavobacterium*, w szczególności patogennych gatunków *F. psychrophilum*, *F. columnare* i *F. branchiophilum*. Własne szczepy *F. branchiophilum*, *F. columnare*, *F. johnsoniae*, *F. aquatile*, *F. fryxellicola*, *F. frigidimaris*, *F. psychrolimnae* i *Chryseobacterium* sp., jak również szczepy referencyjne zostały wykorzystane do stworzenia własnej referencyjnej bazy danych. Pozwoliło to na szybką identyfikację izolatów *Flavobacterium*, a otrzymane wyniki odzwierciedlały przynależność taksonomiczną uzyskaną z analizy sekwencji genu 16S rRNA. Na poziomie gatunkowym MALDI-TOF MS zidentyfikował niezawodnie wszystkie *F. psychrophilum* (n = 61), *F. hercinium* (n = 7), *F. succinicans* (n = 5), *F. frigidimaris* (n = 2), *F. aquatile* (n = 1), *F. columnare* (n = 1) i *F. psychrolimnae* (n = 1). Tylko 5 próbek środowiskowych *F. aquidurens* nie zostało zidentyfikowanych za pomocą MALDI-TOF MS (42). Fernandez-Alvarez i wsp. (14) także utworzyli bibliotekę widm masowych poprzez analizę 70 szczepów *F. psychrophilum* reprezentujących serotypy O1, O2a, O2b i O3, w tym izolatów referencyjnych i klinicznych oraz szczepów blisko spokrewnionych, takich jak: *F. flevense*, *F. succinicans*, *F. columnare*, *F. branchiophilum* i *F. johnsoniae*. Badania wykazały, że dwa piki przy m/z 3544.52 i 5010.66 zostały wykryte w widmach wszystkich badanych gatunków, co sugeruje, że piki te mogą być użytecznymi biomarkerami do identyfikacji bakterii należących do różnych gatunków *Flavobacterium*. Co więcej, w widmach wszystkich szczepów *F. psychrophilum* wykryto łącznie 14 wysoce powtarzalnych pików (2289.45, 3092.12, 3363.97, 4585.27, 5389.16, 6186.70, 6562.89, 6731.83, 7311.55, 7690.57, 8736.16, 9340.86, 10,542.02, 11,309.75), które występowały niezależnie od serotypu, źródła izolacji lub obszaru geograficznego. Zatem piki te mogą być potencjalnymi biomarkerami *F. psychrophilum*, które można wykorzystać do wykrywania i diagnozowania chorób wywoływanych przez te bakterie. W badaniu wykazano także, że cztery wzorce pików masowych są powiązane z głównymi patogennymi serotypami *F. psychrophilum*: serotyp O1 (piki przy m/z 12 547.89 i 13 906.13); serotyp O2a (piki przy m/z 5176.46, 12 547.89 i 13 906.13); serotyp O2b (piki mas przy m/z 5895.25) oraz serotyp O3 (piki mas przy m/z 5176.46 i 5895.25). Zatem obecność lub brak tych markerów może być wykorzystane do identyfikacji epidemiologicznie ważnych serotypów powodujących zaburzenia zdrowotne u ryb łososiowatych (14). W ostatnich latach opisano także kilka nowych gatunków *Flavobacterium*, jak: *F. plurextorum*, *F. tractae*, *F. collinsii*, *F. oncorhynchi* i *F. piscis*, które zostały

wyizolowane od narybku pstrąga tęczowego, mającego objawy kliniczne podobne do tych występujących przy zakażeniu *F. psychrophilum* (16). By móc wykorzystać metodę MALDI-TOF MS do odróżniania tych bakterii, Perez-Sancho i wsp. wygenerowali widma mas dla wszystkich wyżej wymienionych gatunków. Jak pokazały wyniki, *F. psychrophilum* wykazywał widmo mas bardzo różniące się od widma mas nowych gatunków, z pięcioma pikami (m/z 3654, 4585, 5388, 6730 i 7310) obecnymi tylko w izolatach *F. psychrophilum* i trzema pikami (m/z 6170, 7098 i 9241) nieobecnymi u *F. psychrophilum*, ale obecnymi u wszystkich pozostałych analizowanych gatunków. Widma nowych gatunków były ogólnie dość podobne, w szczególności widma mas *F. oncorhynchi* i *F. plurextorum* oraz *F. tructae* i *F. collinsii*, co sugeruje potencjalne problemy z właściwą identyfikacją tych gatunków, stosując metodę MALDI-TOF MS. Użyteczność MALDI-TOF MS do identyfikacji gatunków *Flavobacterium* była zmienna, dlatego też metoda MALDI-TOF MS uzupełniona kilkoma prostymi testami biochemicznymi może być stosowana do rutynowej identyfikacji różnych gatunków *Flavobacterium* (*F. plurextorum*, *F. oncorhynchi*, *F. tructae*, *F. collinsii* i *F. piscis*), które mogą być izolowane od chorych ryb podejrzanych o zakażenie *F. psychrophilum* (33).

Jak wykazały badania przeprowadzone przez LaFrentz i wsp. (26), w obrębie gatunku *F. columnare* istnieją cztery odrębne grupy genetyczne. Podział ten wynika z różnic dotyczących żywiciela i wirulencji bakterii. Wykazano, że izolaty z grupy genetycznej 1 są wysoce zjadliwe dla pstrąga tęczowego, podczas gdy izolaty z grup genetycznych 3 i 2 wykazywały, odpowiednio, umiarkowaną i niską zjadliwość (12). Izolaty z grupy genetycznej 2 wydają się bardziej zjadliwe niż izolaty należące do grup genetycznych 1 i 3 u suma kanałowego (41). Wreszcie, udokumentowano związek między izolatami pozyskanymi od tilapii a bakteriami należącymi do grupy genetycznej 4 (25). Analiza widm szczepów *F. columnare* pozwoliła na identyfikację licznych pików (m/z) unikalnych dla każdej grupy genetycznej. Pik 3606 m/z był unikalny dla izolatów z grupy genetycznej 2, pik 6525 m/z był unikalny dla izolatów z grupy genetycznej 3, pik 6540 m/z unikalny dla izolatów z grupy genetycznej 4, natomiast brak któregośkolwiek z trzech pików był charakterystyczny dla izolatów z grupy genetycznej 1. Wyniki te wskazują na możliwość identyfikacji czterech proponowanych grup genetycznych w rutynowych badaniach za pomocą MALDI-TOF MS bez sekwencjonowania genetycznego (26).

Rodzaj *Shewanella* charakteryzuje się wysoką różnorodnością (ponad 100 gatunków zgłoszonych do tej pory), co wiąże się z problemami z identyfikacją gatunków (<https://www.bacterio.net/genus/shewanella>). Początkowe badania wykonane w 2017 r. przez Jung-Schroers i wsp. (19) wykazały, że wykrywanie bakterii *Shewanella* metodą MALDI-TOF MS jest ograniczo-

ne. Było to związane z faktem, że tylko widma dla sześciu gatunków *Shewanella* spp. (*S. algae*, *S. baltica*, *S. fidelis*, *S. frigidimarina*, *S. profunda* i *S. putrefaciens*) były obecne w bazie danych Biotyper. Jednak w 2021 r. Yu i wsp. (45) poszerzyli referencyjną bazę o widma reprezentujące 36 gatunków *Shewanella*, co umożliwiło poprawne zidentyfikowanie na poziomie gatunku aż 92,8% (116/125) szczepów. Ponadto, zastosowanie modeli uwzględniających zidentyfikowane piki specyficzne dla gatunku pozwoliło na poprawę identyfikacji na poziomie gatunku do 100%.

Metoda MALDI-TOF-MS była także stosowana do identyfikacji niektórych bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae* (29, 34). Badania prowadzone przez Ojasanya i wsp. (29) wykazały wysoką skuteczność tej metody w diagnostyce *Y. ruckeri* pozyskanych od różnych gatunków ryb oraz brak reakcji krzyżowych w stosunku do gatunków blisko spokrewnionych z *Y. ruckeri*. Badania przeprowadzone przez Nhu i wsp. wykazały, że wszystkie badane szczepy *Edwardsiella ictaluri* izolowane od ryb wykazujących zaburzenia zdrowotne, zostały prawidłowo zidentyfikowane metodą MALDI-TOF MS do poziomu gatunku, odnotowując specyficzne dla tego gatunku piki mas przy 2658, 5321, 6259, 9281, 9465 i 11542 m/z (28). Reichley i wsp. wykazali, że MALDI-TOF MS był w stanie poprawnie zidentyfikować wszystkie badane izolaty *E. tarda*, *E. ictaluri* i *E. hoshinae*. Brak profili dla *E. anguillarum* i *E. piscicida* w bazie danych firmy Bruker, spowodował, że izolaty te były początkowo błędnie identyfikowane jako *E. tarda*. Dopiero analiza z uwzględnieniem gatunkowo specyficznych pików (7,628 m/z u *E. anguillarum*, 8,793 m/z u *E. piscicida* oraz 4,252 m/z u *E. tarda*) pozwoliła na wiarygodne różnicowanie tych bakterii (37). Ponadto, MALDI-TOF MS okazał się być przydatną metodą do identyfikacji bakterii należących do rodzaju *Citrobacter*, wśród których *C. braakii* oraz *C. freundii* mają największe znaczenie w patologii ryb (23, 24, 38, 44). Badania przeprowadzone przez Kolínská i wsp. wykazały, że metoda MALDI-TOF MS była w stanie prawidłowo zidentyfikować 145 (95%), spośród 155 analizowanych szczepów (23).

Photobacterium damsela jest dobrze poznanym patogenem ryb, obejmującym dwa podgatunki (*damsela* i *piscicida*), które wykazują istotne różnice w odniesieniu do ich epidemiologii i patogenności dla zwierząt i ludzi. Pérez-Sancho i wsp. (31) zbadali przydatność MALDI-TOF MS do szybkiej identyfikacji izolatów *P. damsela*, jak również do rozróżniania obu podgatunków. Przy użyciu biblioteki Biotyper metoda MALDI-TOF MS poprawnie zidentyfikowała wszystkie izolaty na poziomie gatunku. Identyfikacja na poziomie podgatunku nie była wiarygodna. Dopiero zastosowanie modelu uwzględniającego specyficzne piki dla podgatunków (m/z 4183 i 8367 dla subsp. *damsela* i 4197, 8397 i 8856 dla subsp. *piscicida*) umożliwiło odróżnienie izolatów *P. dam-*

selae subsp. *piscicida* od izolatów *P. damsela* subsp. *damsela*.

Metoda MALDI-TOFMS została także oceniona pod kątem identyfikacji i różnicowania gatunków *Tenacibaculum*. Większość gatunków z rodzaju *Tenacibaculum* nie była uwzględniona w bazie danych firmy Bruker. W konsekwencji tylko szczepy należące do gatunku *T. discolor*, którego widmo mas istniało w bazie danych firmy Bruker, zostały poprawnie zidentyfikowane przez Fernández-Álvarez i wsp. (15) po analizie za pomocą oprogramowania Biotyper. Jednak sześć z siedmiu gatunków uwzględnionych w badaniu (*T. maritimum*, *T. soleae*, *T. gallaicum*, *T. dicentrarchi*, *T. litoreum* i *T. ovolyticum*) nie zostało sklasyfikowanych. Co więcej, szczepy *T. gallaicum* i *T. litoreum* zostały błędnie zidentyfikowane jako *T. discolor*. Gdy profile białek wszystkich szczepów *Tenacibaculum* zostały porównane, osiem specyficznych dla rodzaju pików mas przy m/z 2273,50; 2433,48; 2661,82; 4789,03; 5048,15; 5314,34; 10507,39; i 13148,28 zidentyfikowano we wszystkich analizowanych gatunkach *Tenacibaculum*. Ponadto, co najmniej jeden pik specyficzny dla gatunku został znaleziony w gatunkach *T. maritimum* (m/z 9408,33), *T. soleae* (m/z 3037,65), *T. dicentrarchi* (m/z 2579,41 i 3053,08), *T. litoreum* (m/z 5477,80) i *T. ovolyticum*, umożliwiając ich rozróżnienie na poziomie gatunkowym. Najbardziej nietypowy profil białkowy zaobserwowano dla szczepu *T. ovolyticum* DSM18103, który wykazał sześć specyficznych pików (przy m/z 2703,13; 5227,72; 8498,79; 9922,69; 10239,19; i 10582,04) dla tego gatunku. Nie znaleziono jednak żadnych specyficznych pików mas dla szczepów *T. discolor* i *T. gallaicum*. Co więcej, szczepy tych gatunków miały wspólny pik przy m/z 12741,15, co uniemożliwiało rozróżnianie tych dwóch gatunków. Analiza MALDI-TOF MS całych komórek szczepów referencyjnych nie pozwoliła na uzyskanie powtarzalnych widm masowych niezależnie od badanego gatunku *Tenacibaculum* lub podłoża hodowlanego stosowanego do wzrostu bakterii. Co więcej, widma uzyskane przy użyciu całych komórek bakteryjnych wykazały zmniejszoną liczbę jonów masowych, słabą rozdzielczość i wysoki poziom szumów. W przeciwieństwie do tego, analiza ekstraktów komórkowych dostarczyła powtarzalne widma mas dla wszystkich analizowanych szczepów, z dobrą rozdzielczością

i niskim poziomem szumów (15). Podobne wyniki uzyskali Böhme i wsp. (4). Wskazali oni, że analiza ekstraktów komórkowych ma kilka zalet, skutkując widmami z mniejszym szumem i bardziej powtarzalnymi jonami masowymi w porównaniu z widmami uzyskanymi z zawiesin całych komórek.

Badania przeprowadzone przez Assis i wsp. (2) wykazały, że wszystkie szczepy *Streptococcus agalactiae* i *Lactococcus garvieae* zostały prawidłowo zidentyfikowane na poziomie gatunku przy użyciu bazy danych firmy Bruker. Jednak identyfikacja *S. iniae* była możliwa tylko dla około 53% izolatów na poziomie rodzaju, gdyż profile dla tego gatunku nie były obecne w bazie danych firmy Bruker. Identyfikacja *S. iniae* była możliwa jedynie poprzez dopasowanie do *S. pyogenes* i *S. dysgalactiae*, które mają część wspólnych pików (22). Dopiero po utworzeniu nowych widm mas dla *S. iniae* możliwe było poprawne zidentyfikowanie wszystkich szczepów na poziomie gatunku. Badania

Tab. 1. Charakterystyczne piki mas wybranych patogenów ryb

Nazwa	Charakterystyczne wartości m/z
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5003
<i>Aeromonas bestiarum</i>	7360
<i>Aeromonas sobria</i>	4460
<i>Aeromonas veronii</i>	4490
<i>Aeromonas salmonicida</i>	2028.35
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	2105.56, 3112.87, 3293.22, 3400.97, 4117.59, 5105.56, 6804.55, 8884.05
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	3011.77, 3372.66, 3762.02, 6747.92 i 9014.04
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	2461.93, 2920.31, 3082.85, 3435.62, 3739.54, 5930.05, 7283.06
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	2289.45, 3092.12, 3363.97, 4585.27, 5389.16, 6186.70, 6562.89, 6731.83, 7311.55, 7690.57, 8736.16, 9340.86, 10542.02, 11309.75
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> : serotyp O1	12 547.89 i 13 906.13
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> : serotyp O2a	5176,46; 12 547,89 i 13906,13
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> : serotyp O2b	5895,25
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> : serotyp O3	5176,46 i 5895,25
<i>Flavobacterium columnare</i> z grupy genetycznej 2	3606
<i>Flavobacterium columnare</i> z grupy genetycznej 3	6525
<i>Flavobacterium columnare</i> z grupy genetycznej 4	6540
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	2658; 5321; 6259; 9281; 9465 i 11542
<i>Edwardsiella anguillarum</i>	7,628
<i>Edwardsiella piscicida</i>	8,793
<i>Edwardsiella tarda</i>	4,252
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	4183 i 8367
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	4197; 8397 i 8856
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	9408,33
<i>Tenacibaculum soleae</i>	3037,65
<i>Tenacibaculum dicentrarchi</i>	2579,41; 3053,08
<i>Tenacibaculum litoreum</i>	5477,80
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	2703,13; 5227,72; 8498,79; 9922,69; 10239,19; 10582,04

przeprowadzone przez Piamsomboon i wsp. wykazały, że identyfikacja gatunków *S. agalactiae* przy użyciu biblioteki Biotyper była niemożliwa dla 40% badanych izolatów, natomiast identyfikacja gatunków *S. iniae* w ogóle nie była możliwa przy zastosowaniu biblioteki Biotyper. Dokładna identyfikacja została uzyskana dopiero przy użyciu bazy danych Biotyper uzupełnionej o profile mas lokalnych szczepów. Wyniki badań wykazały także, że niestandardowa baza danych zapewniła 100% zgodność z sekwencjonowaniem genu 16S rRNA, podczas gdy baza danych firmy Bruker zapewniła dopasowanie na poziomie 30% (34). Badania wykazały, że podczas identyfikacji Gram-dodatnich bakterii metodą MALDI-TOF MS zalecane jest stosowanie ekstrakcji w przeciwieństwie do diagnostyki większości bakterii Gram-ujemnych izolowanych od ryb (1, 11).

Wstępne badania metodą MALDI-TOF MS nie umożliwiły identyfikacji *R. salmoninarum* wywołującą bakteryjną chorobę nerek, co było związane z brakiem profili dla tej bakterii w bazie danych firmy Bruker. Profile widm dla kilkunastu szczepów tej bakterii zostały wprowadzone do bazy danych przez Jansson i wsp. (17). Najnowsze badania przeprowadzone przez Jia i wsp. wykazały, że MALDI-TOF MS był w stanie zidentyfikować większość izolatów (od 95,7% do 100%) *R. salmoninarum*. Jak sugerowali autorzy, niepowodzenie w identyfikacji wszystkich izolatów *R. salmoninarum* mogło wynikać z powodu występowania różnych szczepów tej bakterii, których profile mas różnią się od profilu szczepu referencyjnego wprowadzonego do bazy danych (18).

Przez wiele lat gatunki prątków (*Mycobacterium*) okazały się być trudne do identyfikacji za pomocą MALDI-TOF MS, głównie ze względu na złożony skład ich ściany komórkowej, mniejszą liczbę białek rybosomalnych i ich powolny wzrost. Dlatego dla tych bakterii zmieniono kryteria stosowane w interpretacji wyników z zastosowaniem metody MALDI-TOF MS. Przyjęto, że wartość $> 1,8$ wskazuje na wiarygodną identyfikację, natomiast wartość $< 1,6$ wskazuje na niewiarygodny wynik (35). Obecnie MALDI-TOF MS jest powszechnie stosowaną metodą do rozróżniania *M. marinum*, *M. peregrinum* i *M. abscessus* (36). Za pomocą metody MALDI-TOF możliwe jest także różnicowanie blisko spokrewnionych gatunków *M. chimaera* i *M. intracellulare*, poprzez wykrywanie obecności pików specyficznych dla gatunku (35).

Jak wykazały powyższe badania, MALDI-TOF MS to najbardziej obiecująca metoda stosowania w identyfikacji większości bakterii izolowanych od ryb, z możliwością dalszych ulepszeń. Metoda ta nadaje się do specyficznej identyfikacji wielu patogenów ryb i jest wykorzystywana jako narzędzie do klasyfikacji izolatów na poziomie rodzaju lub gatunku. Zapewnia doskonałą dokładność i specyficzność z wysoką przepustowością, analiza danych jest łatwa, czas uzyskania wyniku wynosi zaledwie kilka minut po wyhodowaniu

organizmu, co w porównaniu z 24-48-godzinnym czasem potrzebnym do identyfikacji drobnoustrojów metodami biochemicznymi jest dużą oszczędnością czasu. Dokładniejsza identyfikacja jest możliwa przy wykorzystaniu algorytmów opartych na obecności lub braku specyficznych pików służących jako biomarkery. Wymaga to identyfikacji i dokładnego porównania unikalnych, stabilnych różnic w widmach bakterii, których białka są wystarczająco różne.

Zastosowanie metody ma pewne ograniczenia, gdyż identyfikacja jest możliwa wyłącznie dla dobrze scharakteryzowanych mikroorganizmów ze znanymi profilami białkowymi dostępnymi w bazach danych. Bazy te mogą być aktualizowane i rozszerzane poprzez tworzenie nowych profili opartych na referencyjnych szczepach bakterii oraz łatwo wymieniane cyfrowo między laboratoriami. Kluczowe jest analizowanie profili białkowych dobrze scharakteryzowanych szczepów różnych gatunków bakterii pochodzących od ryb w celu stworzenia wysokiej jakości baz danych MALDI-TOF MS jako narzędzia do szybkiej identyfikacji. Nowe, obiecujące zastosowanie tej metody odnosi się do bezhadowlanej identyfikacji bakterii bezpośrednio z próbek zawierających mieszane kultury, co może być świetną perspektywą w diagnostyce zakażeń bakteryjnych u ryb.

Piśmiennictwo

1. Alatoon A. A., Cunningham S. A., Ihde S. M., Mandrekar J., Patel R.: Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49 (8), 2868-2873.
2. Assis G. B. N., Pereira F. L., Zegarra A. U., Tavares G. C., Leal C. A., Figueiredo H. C. P.: Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1492.
3. Benagli C., Demarta A., Caminada A., Ziegler D., Petrini O., Tonolla M.: A rapid MALDI-TOF MS identification database at genospecies level for clinical and environmental *Aeromonas* strains. *PLoS One* 2012, 7 (10), e48441.
4. Böhme K., Fernández-No I. C., Barros-Velázquez J., Gallardo J. M., Calomata P., Cañas B.: Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *J. Proteome Res.* 2010, 9 (6), 3169-3183.
5. Buller N. B.: Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. Oxfordshire: Cabi Publishing 2004.
6. Chen P. L., Lee T. F., Teng S. H., Teng L. J., Ko W. C., Hsueh P. R.: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry can accurately differentiate *Aeromonas* *diakinesis* from *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii*. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52 (7), 2625-2628.
7. Crump E. M., Perry M. B., Clouthier S. C., Kay W. W.: Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67 (2), 750-759.
8. Deng J., Fu L., Wang R., Yu N., Ding X., Jiang L., Fang Y., Jiang C., Lin L., Wang Y., Che X.: Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. *J. Thorac. Dis.* 2014, 6 (5), 539-544.
9. Dieckmann R., Strauch E., Alter T.: Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 109 (1), 199-211.
10. Donohue M. J., Best J. M., Smallwood A. W., Kostich M., Rodgers M., Shoemaker J. A.: Differentiation of *Aeromonas* isolated from drinking water distribution systems using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007, 79 (5), 1939-1946.
11. Duman M., Altun S., Saticioglu I. B.: General assessment of approaches to the identification of aquatic bacterial pathogens: A Methodological Review. *North Am. J. Aquaculture* 2022, 84, 405-426.

12. Evenhuis J. P., LaFrentz B. R.: Virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Organ. 2016, 120 (3), 217-224.
13. Fernández-Álvarez C., Gijón D., Álvarez M., Santos Y.: First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. Aquac. Rep. 2016, 4, 36-41.
14. Fernández-Álvarez C., Torres-Corral Y., Santos Y.: Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. J. Proteomics. 2018, 170, 59-69.
15. Fernández-Álvarez C., Torres-Corral Y., Salto-Rosero N., Santos Y.: MALDI-TOF mass spectrometry for rapid differentiation of *Tenacibaculum* species pathogenic for fish. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017, 101 (13), 5377-5390.
16. Heckman T. I., Yazdi Z., Pomaranski E. K., Sebastião F. A., Mukkatira K., Vulgar B. M., Cain K. D., Loch T. P., Soto E.: Atypical *flavobacteria* recovered from diseased fish in the Western United States. Front Cell Infect Microbiol. 2023, 19 (13), 1149032.
17. Jansson E., Haenen O., Nonnemann B., Madsen L., Gelderen E. V., Aspán A., Säker E., Gulla S., Colquhoun D. J., Roozenburg-Hengst I., Dalsgaard I.: MALDI-TOF MS: A diagnostic tool for identification of bacterial fish pathogens. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2020, 40 (6), 240-248.
18. Jia B., Burnley H., Gardner I. A., Saab M. E., Doucet A., Hammell K. L.: Diagnosis of *Renibacterium salmoninarum* infection in harvested Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) on the east coast of Canada: Clinical findings, sample collection methods and laboratory diagnostic tests. J. Fish Dis. 2023, 46 (5), 575-589.
19. Jung-Schroers V., Jung A., Ryll M., Bauer J., Teitge F., Steinhagen D.: Methods for identification and differentiation of different *Shewanella* spp. isolates for diagnostic use. J. Fish Dis. 2018, 41 (4), 689-714.
20. Kačániová M., Kluga A., Kántor A., Medo J., Žiarovská J., Puchalski C., Terentjeva M.: Comparison of MALDI-TOF MS Biotyper and 16S rDNA sequencing for the identification of *Pseudomonas* species isolated from fish. Microb. Pathog. 2019, 132, 313-318.
21. Kazazić S. P., Topić Popović N., Strunjak-Perović I., Babić S., Florio D., Fioravanti M., Bojanić K., Čož-Rakovac R.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry identification of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* isolated from sea bass and sea bream. PLoS one 2019, 14 (11), e0225343.
22. Kim S. W., Nho S. W., Im S. P., et al.: Rapid MALDI biotyper-based identification and cluster analysis of *Streptococcus iniae*. J. Microbiol. 2017, 55 (4), 260-266.
23. Kolínská R., Španělová P., Dřevínek M., Hrabák J., Žemličková H.: Species identification of strains belonging to genus *Citrobacter* using the biochemical method and MALDI-TOF mass spectrometry. Folia Microbiol. 2015, 60, 53-59.
24. Książczyk M., Kuczkowski M., Dudek B., Korzekwa K., Tobiasz A., Korzeniowska-Kowal A., Bugla-Płoskońska G.: Application of routine diagnostic procedure, VITEK 2 compact, MALDI-TOF MS, and PCR assays in identification procedure of bacterial strain with ambiguous phenotype. Curr. Microbiol. 2016, 72, 570-582.
25. LaFrentz B. R., García J. C., Waldbieser G. C., Evenhuis J. P., Loch T. P., Liles M. R., Wong F. S., Chang S. F.: Identification of Four Distinct Phylogenetic Groups in *Flavobacterium columnare* with Fish Host Associations. Front. Microbiol. 2018, 9, 452.
26. LaFrentz B. R., Králová S., Burbick C. R., Alexander T. L., Phillips C. W., Griffin M. J., Waldbieser G. C., García J. C., de Alexandre Sebastião F., Soto E., Loch T. P., Liles M. R., Snekvik K. R.: The fish pathogen *Flavobacterium columnare* represents four distinct species: *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium covaie* sp. nov., *Flavobacterium davisii* sp. nov. and *Flavobacterium oreochromis* sp. nov., and emended description of *Flavobacterium columnare*. Syst. Appl. Microbiol. 2022, 45 (2), 126293.
27. Lamy B., Kodjo A., Laurent F. ColBVH Study Group.: Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2011, 71 (1), 1-5.
28. Nhu T. Q., Park S. B., Kim S. W., Lee J. S., Im S. P., Lazarte J. M., Seo J. P., Lee W. J., Kim J. S., Jung T. S.: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry based identification of *Edwardsiella ictaluri* isolated from Vietnamese striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*). J. Vet. Sci. 2016, 17 (3), 377-383.
29. Ojasanya R. A., Gardner I. A., Groman D., Saksida S., Saab M. E., Thakur K. K.: Development and validation of main spectral profile for rapid identification of *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Front Vet. Sci. 2022, 20, 9, 1031373.
30. Patel R.: MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. Clin. Chem. 2015, 61 (1), 100-111.
31. Pérez-Sancho M., Ana I. V., Awad M., Kostrzewa M., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F.: Differentiation of *Photobacterium damsela* subspecies using Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in fish isolates. Aquaculture 2016, 464, 159-164.
32. Pérez-Sancho M., Cerdá I., Fernández-Bravo A., Domínguez L., Figueras M. J., Fernández-Garayzábal J. F., Vela A. I.: Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish *Aeromonas* isolates at species level. J. Fish. Dis. 2018, 41 (10), 1485-1493.
33. Pérez-Sancho M., Vela A. I., Wiklund T., Kostrzewa M., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F.: Differentiation of *Flavobacterium psychrophilum* from *Flavobacterium psychrophilum*-like species by MALDI-TOF mass spectrometry. Res. Vet. Sci. 2017, 115, 345-352.
34. Piamsomboon P., Jaresitthikunchai J., Hung T. Q., Roytrakul S., Wongtavatchai J.: Identification of bacterial pathogens in cultured fish with a custom peptide database constructed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). BMC Vet. Res. 2020, 16 (1), 52.
35. Pranada A. B., Witt E., Bienia M., Kostrzewa M., Timke M.: Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. J. Med. Microbiol. 2017, 66 (5), 670-677.
36. Puk K., Banach T., Wawrzyniak A., Adaszek Ł., Ziętek J., Winiarczyk S., Guz L.: Detection of *Mycobacterium marinum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* and *M. abscessus* in aquarium fish. J. Fish Dis. 2018, 41 (1), 153-156.
37. Reichley S. R., Ware C., Steadman J., Gaunt P. S., García J. C., LaFrentz B. R., Thachil A., Waldbieser G. C., Stine C. B., Buján N., Arias C. R., Loch T., Welch T. J., Cipriano R. C., Greenway T. E., Khoo L. H., Wise D. J., Lawrence M. L., Griffin M. J.: Comparative Phenotypic and Genotypic Analysis of *Edwardsiella* Isolates from Different Hosts and Geographic Origins, with Emphasis on Isolates Formerly Classified as *E. tarda*, and Evaluation of Diagnostic Methods. J. Clin. Microbiol. 2017, 55 (12), 3466-3491.
38. Rödel J., Mellmann A., Stein C., Alexi M., Kipp F., Edel B., Dawczynski K., Brandt C., Seidel L., Pfister W., Löffler B., Straube E.: Use of MALDI-TOF mass spectrometry to detect nosocomial outbreaks of *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2019, 38 (3), 581-591.
39. Sandrin T. R., Goldstein J. E., Schumaker S.: MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. Mass Spectrom Rev. 2013, 32 (3), 188-217.
40. Šedo O., Sedláček I., Zdráhal Z.: Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. Mass Spectrom Rev. 2011, 30 (3), 417-434.
41. Shoemaker C. A., Olivares-Fuster O., Arias C. R., Klesius P. H.: *Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Vet. Microbiol. 2008, 127 (3-4), 353-359.
42. Strepparova N., Segner H., Petrini O., Wahli T.: MALDI-TOF MS for the identification and characterization of *Flavobacterium* isolates from water and environment. *Flavobacterium 2012: The 3rd international Conference on Members of the Genus Flavobacterium*. Turku, Finland 5-7 June 2012.
43. Tanaka K.: The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel Lecture). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2003, 42 (33), 3860-3870.
44. Walczak N., Puk K., Guz L.: Bacterial flora associated with diseased freshwater ornamental fish. J. Vet. Res. 2017, 61 (4), 445-449.
45. Yu K., Huang Z., Li Y., Fu Q., Lin L., Wu S., Dai H., Cai H., Xiao Y., Lan R., Wang D.: Establishment and Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Detection of *Shewanella* Genus. Front Microbiol. 2021, 12, 625821.

Autor korespondencyjny: dr hab. Monika Olech, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: monika.olech@piwet.pulawy.pl