https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-562-566

Оригинальная статья

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Читать онлайн
Read online

Курбатова И.В., Ракитина Д.В., Кравченко Е.С., Мания Т.Р., Асланова М.М., Юдин С.М.

Опыт использования метода времяпролётной масс-спектрометрии для идентификации плесневых грибов

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управление медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия

Введение. *Метод матрично-ассоциированной лазерной масс-спектрометрии широко применяется в микробиологии в силу точности и быстроты получения результатов. Однако применение этого метода для плесневых грибов представляет ряд трудностей и не всегда эффективно.*
Цель и задачи исследования *– определить целесообразность практического применения удлинённого протокола с культивированием в жидкой среде и предварительной экстракцией белков в рутинной идентификации плесневых грибов, выделенных из окружающей среды.*
Материалы и методы. *Проводили анализ музейной коллекции плесневых грибов ФГБУ «ЦСП» ФМБА России методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии для видовой идентификации микроорганизмов с помощью системы идентификации Biotyper (Bruker) с предварительным культивированием в жидкой среде и белковой экстракцией муравьиной кислотой и ацетонитрилом по удлинённому оптимизированному протоколу.*
Результаты. *Проанализировано 137 образцов из коллекции лаборатории микробиологии и паразитологии. Качественные спектры получены для 71,5% изолятов. Идентификация по базе MBT Filamentous Fungi Library с достоверным скором (> 1,7) получена для 55% образцов (26% со скором > 2). Проанализированные образцы включали в себя представителей 19 семейств и 27 родов, 16% образцов демонстрировали спектры высокого качества, но не идентифицировались по базе MBT Filamentous Fungi Library (Bruker).*
Ограничения исследования: *при изучении возможности использования метода времяпролётной масс-спектрометрии для идентификации плесневых грибов был произведён анализ 137 изолятов плесневых грибов из окружающей среды, что представляет собой достаточную референтную выборку. Проанализированные образцы включали в себя представителей 19 семейств и 27 родов, что позволяет применить полученные выводы по крайней мере к этим представителям мицелиальных грибов. В рамках данного исследования не удалось идентифицировать 22 образца со спектрами высокого качества, поэтому предметом дальнейших исследований будет их идентификация молекулярно-генетическими методами, выявление подобных образцов и создание из них новой собственной базы спектров для MALDI-TOF-биотипирования. Предстоит также расширить перечень изучаемых семейств.*
Заключение. *Для эффективной идентификация плесневых грибов с помощью масс-спектрометрических методов целесообразно применять культивирование чистой культуры в жидкой среде, оптимизированный протокол пробоподготовки и создание собственной внутрилабораторной базы данных спектров.*

Ключевые слова: *MALDI-TOF MS; плесневые грибы*

Соблюдение этических стандартов: *в статье не использовались результаты клинических исследований (испытаний) с участием людей или животных в качестве испытуемых. Анализируемые изоляты плесневых грибов высеяны из окружающей среды.*

Для цитирования: Курбатова И.В., Ракитина Д.В., Кравченко Е.С., Мания Т.Р., Асланова М.М., Юдин С.М. Опыт использования метода времяпролётной масс-спектрометрии для идентификации плесневых грибов. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(5): 562-566. https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-562-566

Для корреспонденции: *Мания Тамари Резоевна*, науч. сотр. лаб. микробиологии и паразитологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России 119121, Москва. E-mail: TManiya@cspmz.ru

Участие авторов: *Курбатова И.В.* – концепция и дизайн исследования, сбор материала и микроскопическая идентификация, обработка данных, статистическая обработка, написание текста; редактирование; *Ракитина Д.В.* – концепция и дизайн исследования, сбор материала и обработка данных, идентификация методом MALDI-TOF, статистическая обработка, написание текста, редактирование; *Кравченко Е.С.* – культивирование образцов; *Мания Т.Р.* – написание текста, редактирование; *Асланова М.М.* – концепция и дизайн исследования, редактирование; *Юдин С.М.* – редактирование. *Все соавторы* – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.
Финансирование. Исследование проводилось при поддержке Государственного задания «Разработка унифицированных методов, включающих отбор проб, для осуществления определения микробиологического и паразитологического загрязнения сточных вод» (шифр «Сточные воды») № АААА-А21-121011190012-3.

Поступила: 05.03.2022 / Принята к печати: 12.04.2022 / Опубликована: 31.05.2022

Irina V. Kurbatova, Darya V. Rakitina, Ekaterina S. Kravchenko, Tamari R. Maniya, Mariya M. Aslanova, Sergey M. Yudin

MALDI-TOF MS application for identification of filamentous fungi

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. *MALDI-TOF identification method is widely used in microbiology due to its accuracy and rapid results achievement. However, applying this method to mold fungi faces some difficulties and is not always effective.*
Purpose of the study *was to evaluate the profits of using the long cultivation and protein extraction protocol in routine identification of mold fungi isolates from environment.*
Materials and methods. *The analysis of molds museum collection from Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia was performed by MALDI-TOF mass-spectrometry Biotyper (Bruker Daltonics) with cultivation in liquid media and long optimized protein extraction protocol with acetonitrile and formic acid.*
Results. *One hundred thirty seven isolates were analyzed. Quality spectra were achieved for 71.5% of samples. Identification with MBT Filamentous Fungi Library database with the high confidence score (> 1.7) was achieved for 55% of isolates (26% with score > 2). Samples analyzed included members of nineteen families and 27 genera. 16% of samples were not identified despite producing high-quality spectra.*

Original article

Limitations. *When studying the possibility of using the time-of-flight mass spectrometry method to identify mold fungi, a sample of 137 isolates of mold fungi from the environment was analyzed, which is a sufficient reference sample. The analyzed samples included representatives of 19 families and 27 genera, which makes it possible to apply the findings to at least these representatives of micellar fungi. In this study 22 samples with good quality spectra, were not identified with MBT Filamentous Fungi Library database. In the future studies, these samples, along with other samples like that, will be identified by genetic molecular methods and added to the new home-made database for filamentous fungi MALDI-TOF identification.*

Conclusion. *Effective identification of filamentous fungi by mass-spectrometry methods requires pure culture achieved from liquid media, long optimized protocol of protein extraction and building an in-house database of spectra not presented in Bruker database.*

Keywords: *MALDI-TOF MS; mold fingi*

Compliance with ethical standards. *No clinical samples or analyses from humans and animals were used in this paper. Only environmental filamentous fungi isolates were analysed.*

For citation: Kurbatova I.V., Rakitina D.V., Kravchenko E.S., Maniya T.R., Aslanova M.M., Yudin S.M. MALDI-TOF MS application for identification of mold fungi. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal*). 2022; 101(5): 562-566. https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-562-566 (In Russian)

For correspondence: *Tamari R. Maniya*, researcher of Microbiology and Parasitology laboratory of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks" of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121, Russia Federation. E-mail: TManiya@cspmz.ru

Information about authors:

Kurbatova I.V., https://orcid.org/0000-0003-3152-4862 Rakitina D.V., https://orcid.org/0000-0003-3554-7690 Kravchenko E.S., https://orcid.org/0000-0002-6628-4689
Mania T.R., https://orcid.org/0000-0002-6295-661X Aslanova M.M., https://orcid.org/0000-0002-5282-3856

Contribution: *Kurbatova I.V.* – research concept and design, material collection and microscopic identification data processing, statistical processing, text writing; editing; *Rakitina D.V.* – research concept and design, material collection and data processing, identification by MALDI-TOF statistical processing, text writing; editing; *Kravchenko E.S.* – cultivation of samples; *Maniya T.R.* – writing text; editing; *Aslanova M.M.* – concept and design of the study; editing; *Yudin S.M.* – editing. *All authors* are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The research was carried out with the support of the State Assignment Reg. No. AAAA-A21-121011190012-3, theme " "Development of unified methods, including sampling, for the determination of microbiological and parasitological contamination of wastewater" (code "Wastewater").

Received: March 5, 2022 / Accepted: April 12, 2022 / Published: May 31, 2022

Введение

Идентификация бактерий методом MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) признана «золотым стандартом» клинической микробиологии, поскольку обеспечивает быстроту и высокую точность идентификации при невысокой стоимости анализа одного образца [1]. В то же время идентификация плесневых грибов, имеющих важное клиническое и экологическое значение, представляется затруднительной [2–4].

В настоящее время идентификация плесневых грибов основывается на макроскопических и микроскопических наблюдениях роста колоний на селективных средах. Адекватная фенотипическая идентификация плесневых грибов требует привлечения миколога высокой квалификации, что не всегда возможно в клинических лабораториях. Помимо этого некоторые фенотипически неразличимые грибы могут быть идентифицированы на основании анализа последовательности рибосомальной РНК. Генетический метод идентификации имеет определённые ограничения: низкое количество выделяемой ДНК за счёт трудностей лизиса клеток, ингибирование ПЦР-реакции веществами, содержащимися в культуре, длительность идентификации до 7 дней, что негативно сказывается на лечении пациента [5–7].

Метод MALDI-TOF MS-идентификации основан на анализе спектра белков («белкового отпечатка пальцев») культивированного микроорганизма. Неизвестная культура определяется по сравнению её спектра с референтными спектрами известных микроорганизмов из базы данных. Этот метод быстр, достаточно точен и эффективен, однако для плесневых грибов результаты подвержены влиянию условий культивирования, процедур экстракции и т. д.

Коммерческий продукт фирмы Bruker позволяет выполнять идентификацию 152 видов плесневых грибов. В ряде исследований сообщается о создании внутрилабораторных баз данных для идентификации, включающих широкий спектр видов плесневых грибов – от 140 до 200 и более [8–12].

Исследователи высказывают разное мнение о точности метода MALDI-TOF в этой области – идентификации поддаются 54–87% тестируемых образцов [13–17].

Цель работы – оценить применимость метода MALDI-TOF для клинической идентификации плесневых грибов и отработать протоколы его применения.

Материалы и методы

Изоляты. В данном исследовании анализировали музейную коллекцию выделенных из окружающей среды плесневых грибов, собранную в ФГБУ «ЦСП» ФМБА. Для 137 изолятов проведена микроскопическая идентификация мицелия и культивирование в жидкой среде.

Микроскопическая идентификация. Идентификацию плесневых грибов проводили методами микроскопического и макроскопического наблюдения мицелиальных культур, выросших на плотной среде Сабуро при температуре плюс 27 °С за время от 3 до 5 дней. Определение рода и вида грибов проводили в соответствии с указаниями определителей [18–22].

Культивирование изолятов плесневых грибов для MALDI-TOF-идентификации. Образцы из музейной коллекции высевали на плотные среды Сабуро с 2%-м агаром и инкубировали при температуре плюс 27 °С в течение 48 ч. По результатам анализа мицелия, выросшего на чашке, проводили подтверждение микроскопической идентификации образца и отсутствия загрязнения культурами других видов.

Для дальнейшего масс-спектрометрического анализа проводили культивацию образцов в жидкой среде Сабуро при температуре плюс 27 °С и перемешивании со скоростью 30 об./мин. После 24 ч культивирования материал осаждали центрифугированием, удаляли питательную среду и трижды промывали осадок (с перемешиванием и осаждением центрифугированием) 1 мл деионизованной воды. При необходимости осадок хранили при минус 20 °С.

Экстракция белков. Для экстракции белков используется оптимизированный протокол Bruker с модификацией [23]. К промытым осадкам культивированных изолятов плесневых грибов добавляли 0,3 мл деионизованной воды и 0,9 мл 95%-го этанола, перемешивали. Центрифугировали при 13 000 g в течение 2 мин, отбрасывали супернатант. Осадок сушили 15 мину при температуре плюс 30 °*C*. К осадку добавляли 10–30 мкл (в зависимости от объёма осадка) 70%-й муравьиной кислоты, перемешивали. Инкубировали в течение 10 мин на столе, добавляли объём ацетонитрила, равный объёму муравьиной кислоты, перемешивали и продолжали инкубирование в течение 10 мин на столе. Образец перемешивали, центрифугировали при 13 000 g в течение 2 мин, затем 1 мкл супернатанта наносили на MALDI-мишень. После высыхания покрывали 1 мкл матрицы HCCA и высушивали.

https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-562-566

Оригинальная статья

Рис. 1. Эффективность идентификации плесневых грибов с использованием MALDI-TOF Biotyper (Brukers Daltonics). Указано количество изолятов для каждой группы идентификации.

Fig. 1. The efficiency of filamentous fungi samples identification by MALDI-TOF Biotyper (Brukers Daltonics). Number of isolates is indicated for every identification group.

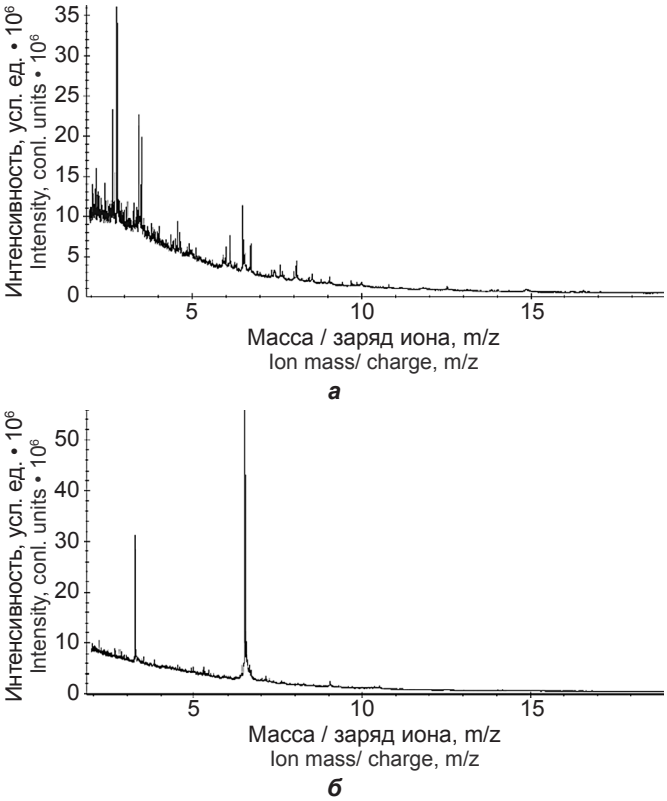

Рис. 2. Сравнение спектров различных культур *Aspergillus niger*: *а* – мицелий белого цвета без спор; *б* – мицелий чёрного цвета со спорами.

Fig. 2. Comparison of spectra of *Aspergillus niger* cultures: *a* – white mycelium with no spores; *б* – black mycelium with spores.

MALDI-TOF-идентификация. Видовую идентификацию изолятов проводили методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) с использованием базы бактериальных белковых спектров и программного обеспечения MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG). Идентификацию выполняли согласно протоколу производителя (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) с использованием базы данных для плесневых грибов MBT Filamentous Fungi Library (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG).

Результаты

Проанализировано 137 образцов из коллекции лаборатории микробиологии и паразитологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА. Качественные спектры получены для 105 образцов (76,6%). Из них идентифицировано по базе MBT Filamentous Fungi Library с достоверным скором (> 1,7) 78 образцов (36 образцов со скором > 2) (рис. 1).

Проанализированные образцы включали в себя представителей 19 семейств и 27 родов (см. таблицу). Для 55 (40%) образцов идентификация методом MALDI-TOF MS не противоречила идентификации микроскопическим методом.

Для 23 образцов (17%) идентификация методом MALDI-TOF MS расходилась с микроскопической, причём правильность масс-спектрометрической идентификации подтверждалась при анализе биологических повторов. Такое высокое число расхождений не должно смущать, так как расхождения в подавляющем большинстве случаев непринципиальны. Например, у *Penicillium* отличался конкретный вид (предполагался *citrinum*, а определялся *chrysogenum*). Может показаться странным случай *Paecilomyces* без единого совпадения идентификаций. Однако разночтения эти мнимые: определявшиеся виды таксономически чрезвычайно близки роду *Paecilomyces*, будучи либо выделенными из него недавно (*Purpureocillium lilacinum*), либо являясь анаморфой *Paecilomyces* (*Byssochlamys spectabilis*). Такие моменты следует учитывать, но они не свидетельствуют об ошибочности идентификации каким-либо методом. Однако есть и случаи прямого необъяснимого расхождения. Например, четыре образца, определённые как *Aspergillus* по микроскопии и типированные как *Penicillium*.

Также было выявлено 27 образцов (19,7%) со спектрами высокого качества, не идентифицируемые по базе MBT Filamentous Fungi Library (см. рис. 1). Для части из них это объясняется отсутствием предполагаемого рода или вида грибов в базе данных Bruker (например, *Gliocladium*, *Vetricillium*). Для остальных это можно было бы объяснить загрязнением образца (чему противоречит воспроизведение спектров в двух биологических и двух механических повторах) или несоответствием микроскопического определения вида реальному (отсутствующему в базе данных). В целом сравнение эффективности микроскопической и MALDI-TOF-идентификации показывает корректность последней. При этом для 13 изолятов, не имевших микроскопической идентификации, идентифицировать методом MALDI-TOF удалось только три, хотя качественные спектры получены для девяти.

Обсуждение

В отличие от бактериальных и дрожжевых культур инструкция производителя Bruker предлагает после высевания плесневых грибов на селективные плотные среды культивирование образцов в жидкой среде.

В наших опытах показано ключевое значение режима культивации культур для получения воспроизводимых спектров. Необходимо ротационное культивирование мицелия в жидкой среде Сабуро или отбор свежих белых фрагментов мицелия на агаре Сабуро, причём во втором случае следует избегать захвата спор.

Original article

Образцы плесневых грибов, идентифицированные с использованием MALDI-TOF Biotyper (Brukers Daltonics)
Mold fungi samples, identified by MALDI-TOF Biotyper (Brukers Daltonics)

Род / вид, согласно микроскопии Genus or species according to microscopy	Идентифицировано Identified	MALDI-TOF идентификация отличается от микроскопии MALDI-TOF identification differs from microscopy	Неидентифицированные хорошие спектры Non-identified high quality spectra	Спектров нет No quality spectra	Присутствует в базе Filamentous Fungi Species and genus in Filamentous Fungi database
Acremonium			1		*Acremonium cereale*
Alternaria	1			2	*Alternaria alternata*
Aspergillus	14	4	2	5	33 вида и род spp. / Thirty three species and genus spp.
Botrytis		1			*Botrytis cinerea*
Byssochlamys spectabilis	1				4 вида / Four species
Chaetomium	1		2		*Chaetomium globosum*
Cladosporium			1	1	3 вида и род spp. /Three species and genus spp.
Colletotrichum gloesporioides				1	Присутствует / Present
Cryptococcus			1		20 видов / Twenty species
Cunninghamellaceae			1		*Cunninghamella elegans*
Fusarium	7	2	2	2	13 видов и spp. / Thirteen species and genus spp.
Gliocladium			1		–
Lichtheimia corymbifera	1				Присутствует / Present
Microsporum canis				1	Присутствует / Present
Mucor	6	2	2	8	7 видов / Seven species
Paecilomyces		4	1		2 вида / Two species
Penicillium	15	2		5	26 видов и род spp. / Twenty six species and genus spp.
Plectosphaerella cucumerina	1				Присутствует / Present
Pseudogymnoascus		1			*Pseudogymnoascus pannorum*
Purpureocillium		1			*Purpureocillium lilacinum*
Rhizopus	2				4 вида / Four species
Scopulariopsis brevicaulis	2	1			Присутствует / Present
Syncephalastrum racemosum				1	Присутствует / Present
Trichoderma	1	2	4	1	3 вида и род spp. / Three species and genus spp.
Trichophyton		2		1	8 видов / Eight species
Trichosporon		1			19 видов и род spp. / Nineteen species and genus spp.
Verticillium			3		–
Неизвестно	3		6	4	–

Данная методика существенно удлиняет и усложняет анализ, но она является необходимой для обеспечения эффективного и высоковоспроизводимого определения родов и видов плесневых грибов. Причины этого следующие.

1. Культивированием в жидкой среде удаётся создать более равномерные условия роста для отдельных клеток. Таким образом клетки становятся более гомогенными и продуцируют идентичные спектры, что необходимо для воспроизводимой идентификации.
2. Культивирование в жидкой среде позволяет избежать формирования плотного мицелия из клеток плесневых грибов с жёсткими оболочками, поскольку они затрудняют клеточный лизис и экстракцию белков.
3. Культивирование в жидкой среде позволяет избежать образования спор. Как показывает наш опыт, споры продуцируют в спектре ряд ионов очень высокой интенсивности, которые не поддаются типированию, а на фоне их не видны ионы белков обычных клеток (рис. 2). Для сравнения рисунок демонстрирует спектры молодой культуры белого мицелия (периферического) и чёрного мицелия (старого со спорами) *Aspergillus niger*. Спектр со спорами содержит доминирующие пики, которых нет в свежем мицелии, и не определяется алгоритмом Bruker Biotyper.

После культивирования отобранные осадки могут храниться в замороженном виде без потери эффективность определения.

Также в наших экспериментах показана эффективность соблюдения удлинённого протокола экстракции белков (оптимизации к протоколу Bruker, предложенные [23]). В сочетании с культивированием в жидкой среде он позволяет повысить процент качественных спектров до 71%.

Тот факт, что для 29% проанализированных образцов не удалось получить качественные спектры, пригодные для идентификации, говорит о необходимости дальнейшей оптимизации протокола. Введение в протокол различных методов разрушения клеток мицелия (замораживание и размораживание, ультразвуковая и механическая гомогенизация, как предложено [24–26]), не привело к получению спектра образцов, для которых не срабатывал протокол [23]. Трудности с получением качественных спектров не выглядят связанными с конкретным родом плесневых грибов (см. таблицу) – наибольшее количество образцов с плохими спектрами получено для *Aspergillus* и *Penicillum*, но качественно определённых образцов для этих родов не меньше. Возможно, оптимизации требуют условия культивирования.

https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-562-566

Оригинальная статья

Ограничения настоящего исследования позволяют применить полученные выводы к представителям по крайней мере 19 семейств и 27 родов мицелиальных грибов, вошедшим в изученную, достаточно представительную выборку (137 изолятов).

Заключение

Идентификация плесневых грибов с помощью культивирования в жидкой среде, оптимизированного протокола пробоподготовки и системы Bruker Biotyper (база плесневых грибов) весьма перспективна. При необходимости рутинной идентификации плесневых грибов целесообразно создание собственной базы данных с помощью генной идентификации образцов, что позволит повысить процент идентификации плесневых грибов не менее чем на 16%. Удлинённый протокол культивирования и пробоподготовки образцов хотя и требует дополнительного времени, но при этом существенно повышает процент идентификации образцов плесневых грибов методом MALDI-масс-спектрометрии. Сочетание этих оптимизаций метода позволяет определить больше 70% образцов с точностью до вида (группы видов) с высокой достоверностью и без затрат рабочего времени высококвалифицированного специалиста.

Литература

(п.п. 1–17, 21–26 см. References)

18. Билай В.И., Коваль Э.З. *Аспергиллы. Определитель*. Киев: Наукова Думка; 1988.
19. Билай В.И., Курбацкая З.А. *Определитель токсинобразующих микромицетов*. Киев: Наукова Думка; 1990.
20. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. *Определитель патогенных и 103 условно патогенных грибов*. М.: Мир; 2001.

References

1. Patel R. MALDI-TOF mass spectrometry: transformative proteomics for clinical microbiology. *Clin. Chem*. 2013; 59(2): 340–2. https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.183558
2. McElvania TeKippe E., Burnham C.A. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2014; 33(12): 2163–71. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2183-y
3. Bilecen K., Yaman G., Ciftci U., Laleli Y.R. Performances and reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF mass spectrometry systems for the identification of clinical microorganisms. *Biomed Res. Int*. 2015; 2015: 516410. https://doi.org/10.1155/2015/516410
4. Levesque S., Dufresne P.J., Soualhine H., Domingo M.C., Bekal S., Lefebvre B., et al. A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0144878. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144878
5. Chen Y., Prior B.A., Shi G., Wang Z. A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. *J. Microbiol*. 2011; 49(4): 675–9. https://doi.org/10.1007/s12275-011-0525-3
6. Diguta C.F., Vincent B., Guilloux-Benatier M., Alexandre H., Rousseaux S. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiol*. 2011; 28(6): 1145–54. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.006
7. Ferrer C., Colom F., Frasés S., Mulet E., Abad J.L., Alió J.L. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J. Clin. Microbiol*. 2001; 39(8): 2873–9. https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001
8. Normand A.C., Cassagne C., Gautier M., Becker P., Ranque S., Hendrickx M., et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol*. 2017; 17(1): 25. https://doi.org/10.1186/s12866-017-0937-2
9. Gómez-Velásquez J.C., Loaiza-Díaz N., Norela Hernández G., Lima N., Mesa-Arango A.C. Development and validation of an in-house library for filamentous fungi identification by MALDI-TOF MS in a clinical laboratory in Medellin (Colombia). *Microorganisms*. 2020; 8(9): 1362. https://doi.org/10.3390/microorganisms8091362
10. Zvezdanova M.E., Escribano P., Ruiz A., Martínez-Jiménez M.C., Peláez T., Collazos A., et al. Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library. *Med. Mycol*. 2019; 57(1): 63–70. https://doi.org/10.1093/mmy/myx154
11. Stein M., Tran V., Nichol K.A., Lagacé-Wiens P., Pieroni P., Adam H.J., et al. Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses*. 2018; 61(10): 743–53. https://doi.org/10.1111/myc.12800
12. Wilkendorf L.S., Bowles E., Buil J.B., van der Lee H.A.L., Posteraro B., Sanguinetti M., et al. Update on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol*. 2020; 58(12): e01263–20. https://doi.org/10.1128/JCM.01263-20
13. Cassagne C., Ranque S., Normand A.C., Fourquet P., Thiebault S., Planard C., et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28425. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028425
14. Chabasse B. Emergence of new fungal pathogens: general review. *Rev. Francoph. Lab*. 2009; 416: 71–87.
15. Peng Y., Zhang Q., Xu C., Shi W. MALDI-TOF MS for the rapid identification and drug susceptibility testing of filamentous fungi. *Exp. Ther. Med*. 2019; 18(6): 4865–73. https://doi.org/10.3892/etm.2019.8118
16. Hendrickx M. MALDI-TOF MS and filamentous fungal identification: a success story? *Curr. Fungal Inf. Rep*. 2017; 11(2): 60–5. https://doi.org/10.1007/s12281-017-0277-6
17. Reeve M.A., Bachmann D. A method for filamentous fungal growth and sample preparation aimed at more consistent MALDI-TOF MS spectra despite variations in growth rates and/or incubation times. *Biol. Methods. Protoc*. 2019; 4(1): bpz003. https://doi.org/10.1093/biomethods/bpz003
18. Bilay V.I., Koval' E.Z. *Aspergilli. The Determinant [Aspergilly. Opredelitel']*. Kiev: Naukova Dumka; 1988. (in Russian)
19. Bilay V.I., Kurbatskaya Z.A. *Determinant of Toxin-Forming Micromycetes [Opredelitel' toksinobrazuyushchikh mikromitsetov]*. Kiev: Naukova Dumka; 1990. (in Russian)
20. Satton D., Fotergill A., Rinal'di M. *Determinant of Pathogenic and 103 Conditionally Pathogenic Fungi [Opredelitel' patogennykh i 103 uslovno patogennykh gribov]*. Moscow: Mir; 2001. (in Russian)
21. Booth C. *The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Inst*. Kew, Surrey; 1971.
22. Pitt J.I. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*. North Wales; 1991.
23. Schulthess B., Ledermann R., Mouttet F., Zbinden A., Bloemberg G.V., Böttger E.C., et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J. Clin. Microbiol*. 2014; 52(8): 2797–803. https://doi.org/10.1128/JCM.00049-14
24. Ning Y.T., Yang W.H., Zhang W., Xiao M., Wang Y., Zhang J.J., et al. Developing two rapid protein extraction methods using focused-ultrasonication and zirconia-silica beads for filamentous fungi identification by MALDI-TOF MS. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2021; 11: 687240. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.687240
25. Patel R. A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *J. Fungi (Basel)*. 2019; 5(1): 4. https://doi.org/10.3390/jof5010004
26. Becker P.T., de Bel A., Martiny D., Ranque S., Piarroux R., Cassagne C., et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med. Mycol*. 2014; 52(8): 826–34. https://doi.org/10.1093/mmy/myu064