

## ZASTOSOWANIE TECHNIKI MALDI-TOF MS DO IDENTYFIKACJI DERMATOFITÓW

Sebastian Gnat\*, Dominik Łagowski, Aneta Nowakiewicz

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w lipcu 2020 r.

**Streszczenie:** Metoda MALDI-TOF MS jest nowym i coraz częściej wykorzystywanym w laboratoriach klinicznych narzędziem do identyfikacji drobnoustrojów. Szerokie zainteresowanie tą metodą wynika z jej wysokiej dokładności, szybkości uzyskiwania wyników identyfikacji mikroorganizmów oraz stosunkowo niskiego kosztu analiz. Implementacja tej techniki do identyfikacji dermatofitów jest jednak trudna. Trudności te spowodowane są naturalną złożonością biologiczną grzybów strzępkowych, bardzo wolnym tempem wzrostu drobnoustrojów i częstym wytwarzaniem pigmentów. Ponadto, identyfikacja dermatofitów tą techniką stanowi wyzwanie ze względu na brak jasnej definicji gatunku dla niektórych taksonów lub w obrębie niektórych kompleksów gatunkowych. Przegląd literatury naukowej wskazuje, że wiarygodność identyfikacji dermatofitów opartej na MALDI-TOF MS waha się między 13,5 a 100%. Liczne czynniki krytyczne związane z rutynowymi procedurami laboratoryjnymi, tj. rodzajem podłoża hodowlanego, czasem inkubacji, techniką ekstrakcji białek, typem urządzenia czy wersją biblioteki widm referencyjnych, warunkują taką zmienność w uzyskiwanych wynikach. Pomimo wielu ograniczeń metoda MALDI-TOF MS stanowi istotny postęp techniczny w diagnostyce mykologicznej i alternatywę dla czasochłonnej i pracochłonnej identyfikacji dermatofitów opartej o cechy morfologiczne oraz sekwencjonowanie DNA. Niemniej jednak zanim zostanie wdrożona do rutynowych badań diagnostycznych, konieczne jest rozszerzenie biblioteki widm referencyjnych dermatofitów, a także opracowanie procedur analizy bezpośredniej z próbek dermatologicznych.

1. Wprowadzenie. 2. Identyfikacja drobnoustrojów z zastosowaniem metody MALDI-TOF MS. 3. MALDI TOF MS w diagnostyce mykologicznej. 4. Czynniki krytyczne identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF. 4.1. Wpływ stosowanego podłoża mikrobiologicznego. 4.2. Wpływ czasu inkubacji. 4.3. Wpływ procedury ekstrakcji białek i przygotowania matrycy. 4.4. Wpływ stosowanych urządzeń do spektrometrii masowej. 4.5. Wpływ biblioteki widm referencyjnych. 4.6. Wpływ algorytmu porównywania widm. 4.7. Wpływ zmian taksonomicznych. 5. Perspektywy rozwoju MALDI-TOF MS w diagnostyce mykologicznej. 6. Podsumowanie

### APPLICATION OF THE MALDI-TOF MS TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF DERMATOPHYTES

**Abstract:** The MALDI-TOF MS method is a new technique, which is being increasingly used in clinical laboratories for identification of microorganisms. The wide interest in this method has been aroused by its high accuracy, instantaneous identification results, and relatively low cost of analyses. However, the application of this technique for identification of dermatophytes poses difficulties. They are caused by the natural biological complexity of filamentous fungi, very slow growth of cultures, and frequent production of pigments. Furthermore, identification of dermatophytes with this technique is a challenge due to the lack of a clear species definition for some taxa or within certain species complexes. A review of scientific literature indicates that the reliability of identification of dermatophytes based on MALDI-TOF MS is in the range between 13.5 and 100%. This variability is determined by many critical factors associated with routine laboratory procedures, i.e. the type of culture medium, incubation time, protein extraction technique, type of device, or version of the reference spectrum library. Despite these numerous limitations, the MALDI-TOF MS method is part of the significant technical progress in mycological diagnostics and an alternative to the time-consuming and labor-intensive identification of dermatophytes based on morphological traits and DNA sequencing. Nevertheless, before the technique can be implemented into routine diagnostic tests, it is necessary to expand the reference spectra library and develop procedures for direct analysis of dermatological samples.

1. Introduction. 2. Identification of microorganisms using the MALDI-TOF MS method. 3. MALDI TOF MS in mycological identification. 4. Critical factors in identification of dermatophytes with the MALDI-TOF method. 4.1. Impact of the microbiological medium. 4.2. Impact of the incubation time. 4.3. Impact of the protein extraction procedure and preparation of the matrix. 4.4. Impact of the mass spectrometry apparatus. 4.5. Impact of the reference spectrum library. 4.6. Impact of the spectrum comparison algorithm. 4.7. Impact of taxonomic changes. 5. Prospects for the development of MALDI-TOF MS in mycological diagnostics. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** dermatofity, diagnostyka, identyfikacja, MALDI-TOF MS

**Key words:** dermatophytes, diagnostics, identification, MALDI-TOF MS

\* Autor korespondencyjny: dr hab. Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

## 1. Wprowadzenie

Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci stanowią najliczniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupę wszystkich grzybic [22]. Częstość występowania zakażeń grzybiczych o charakterze powierzchniowym wzrosła w ostatnich dziesięcioleciach do takiego poziomu, że grzybice skóry dotyczą obecnie ponad 20–25% światowej populacji, przez co są jedną z najczęstszych postaci infekcji [15]. W literaturze naukowej opisanych jest ponad 50 gatunków dermatofitów sklasyfikowanych przede wszystkim w rodzajach *Trichophyton* (Malmsten 1848), *Microsporum* (Gruby 1843), *Epidermophyton* (Sabour. 1907), *Nannizzia* (Stockdale 1961), *Arthroderma* (Curr. 1860), *Lophophyton* (Matr. & Dasonv. 1899), *Paraphyton* (Y. Gräser, Dukik & de Hoog 2018), *Guarromyces* (Y. Gräser, Dukik & de Hoog 2018) i *Ctenomyces* (Eidam 1880) [22]. Dermatofitem o częstotliwości wywoływania infekcji porównywalnej ze stanem światowej epidemii jest antropofilny gatunek *Trichophyton rubrum* (Sabour. 1911) [15]. Wysoka prevalencja dotyczy również dermatofitów zoofilnych [35]. Obecnie mykolodzy zaliczają do grupy dermatofitów zoofilnych ponad 30 przedstawicieli [15], a najczęściej wymienianymi gatunki o dużym znaczeniu epidemiologicznym są *Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin 1895), *Trichophyton verrucosum* (E. Bodin 1902) i *Microsporum canis* (E. Bodin ex Guég. 1902). Chociaż identyfikacja gatunkowa czynnika dermatomykozy ma kluczowe znaczenie dla skutecznego leczenia grzybic powierzchniowych, badania przeprowadzone w Europie wskazują, że tylko 3,4% lekarzy pierwszego kontaktu i 39,6% lekarzy dermatologów zleca pobieranie próbek przed wdrożeniem terapii [11]. Tak niski odsetek wykonywanych analiz laboratoryjnych w podejrzeniu dermatomykozy może wynikać z długiego czasu oczekiwania na wynik badania z wykorzystaniem konwencjonalnych metod diagnostycznych [1, 16]. Identyfikacja gatunkowa dermatofitów jest zasadniczo przeprowadzana w sposób konwencjonalny, za pomocą badania bezpośredniego i hodowlanego, których celem stanowi ocena struktury morfologicznej uzyskanych kolonii i ich charakterystyka mikroskopowa [22, 47]. Konwencjonalne metody identyfikacji dermatofitów są zatem pracochłonne i ze względu na wysoki stopień podobieństwa morfologicznego między niektórymi gatunkami tej grupy grzybów wymagają dużej wiedzy i doświadczenia diagnosty laboratoryjnego [15, 30]. Dodatkowo, czas uzyskania wyniku badania z wykorzystaniem tych metod może przekraczać nawet 5 tygodni [52].

Metoda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spec-

trometry; desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu i spektrometrią masową) była metodą początkowo zarezerwowaną wyłącznie do badań naukowych, a w laboratoriach mikrobiologicznych pojawiła się około 10 lat temu [33]. Szerokie zainteresowanie tą metodą wynika z jej wysokiej dokładności, szybkości uzyskiwania wyników identyfikacji mikroorganizmów, stosunkowo niskiego kosztu analiz i prostej implementacji do laboratoriów diagnostycznych [15, 49]. Niemniej jednak w literaturze naukowej dostępnych jest tylko kilka doniesień oceniających zastosowanie MALDI-TOF MS do identyfikacji dermatofitów [5, 10, 23, 32, 40, 49, 50]

Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu piśmiennictwa traktującego o zastosowaniu techniki MALDI-TOF MS w diagnostyce dermatomykoz, ze szczególnym uwzględnieniem identyfikacji dermatofitów. Ponadto, w niniejszej pracy opisane są zalety i ograniczenia tej techniki w implementacji do rutynowego stosowania w laboratoriach mykologicznych.

## 2. Identyfikacja drobnoustrojów z zastosowaniem metody MALDI-TOF MS

Spektrometria mas jest techniką stosowaną od końca XIX wieku, jednak do identyfikacji drobnoustrojów zastosowano ją po raz pierwszy w latach 70. XX wieku [3]. Rozwój tej technologii jest przypisywany opracowaniu technik jonizacji MALDI-TOF MS, które umożliwiają kompleksową analizę panelu białkowego mikroorganizmów [33]. Dopiero jednak zmniejszenie rozmiarów spektrometrów masowych, ułatwienie ich obsługi i znaczne obniżenie kosztów tych urządzeń stało się przyczyną ich szerokiego zastosowania nie tylko do badań podstawowych ale również w laboratoriach klinicznych [38]. W metodzie MALDI-TOF MS wykrywane są białka w zakresie mas od 2 do 20 kDa, które reprezentują głównie białka rybosomalne oraz białka metabolizmu podstawowego [49]. Białka te tworzą charakterystyczny dla drobnoustroju „odcisk”, który można porównać z profilami białkowymi zawartymi w bibliotece widm referencyjnych [38]. Pozwala to na ustalenie pozycji taksonomicznej mikroorganizmu do poziomu rodzaju, a w wielu przypadkach także do gatunku, a nawet szczepu [12, 13]. Podczas analizy MALDI-TOF dla każdego jonu oceniane są dwa parametry: stosunek masy do ładunku ( $m/z$ ) oraz współczynnik tzw. intensywności względnej jonu [33]. Widmo białkowe uzyskane w tej analizie jest wstępnie przetwarzane, w celu uzyskania kodu białkowego drobnoustroju (Ryc. 1). Identyfikacja mikroorganizmów za pomocą MALDI-

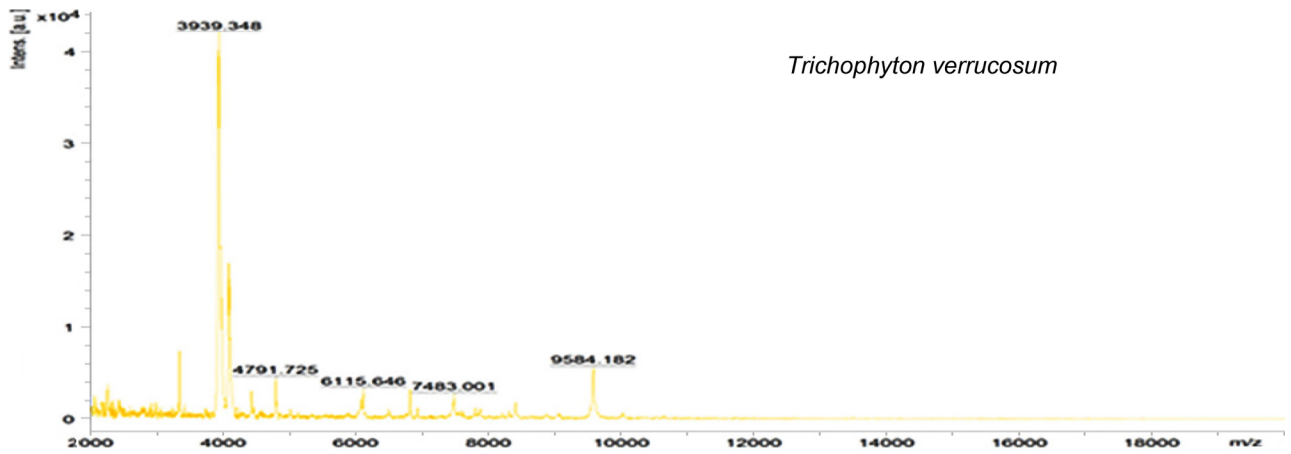
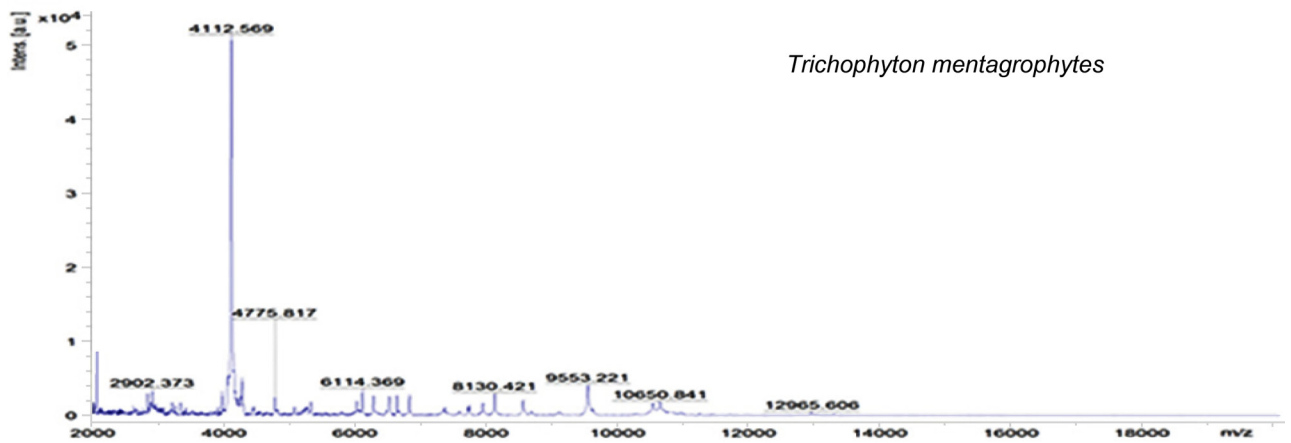
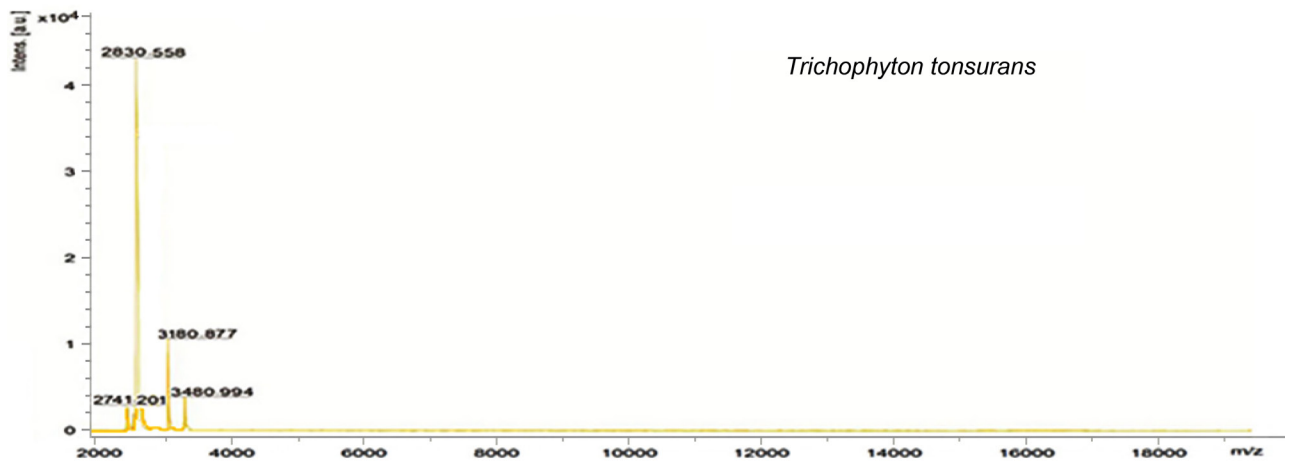
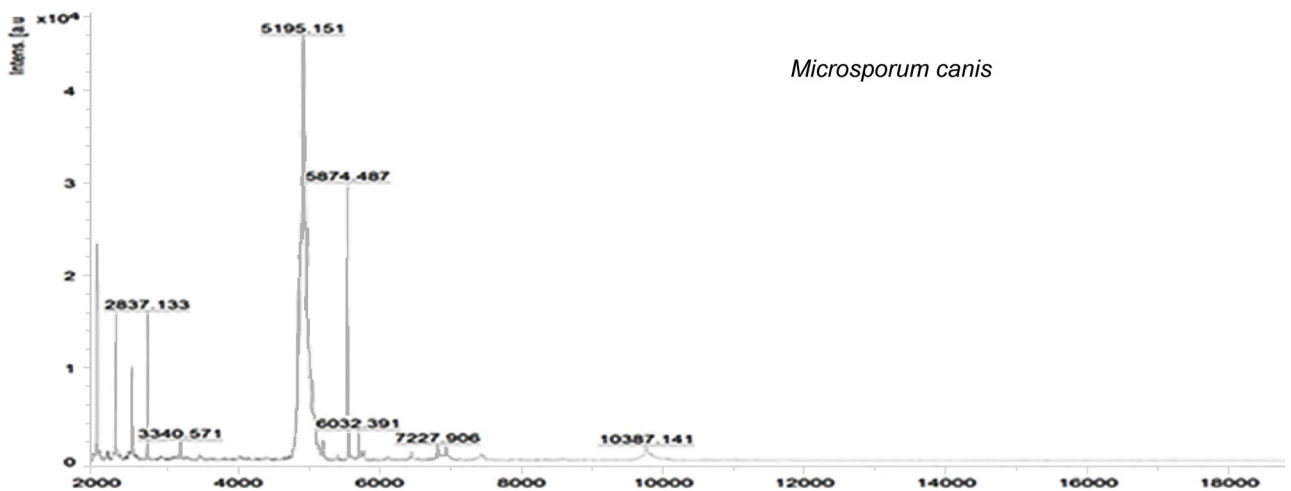
*Trichophyton verrucosum**Trichophyton mentagrophytes**Trichophyton tonsurans**Microsporum canis*

Tabela I  
Porównanie systemów MALDI-TOF MS wykorzystywanych do identyfikacji dermatofitów

Stosowane urządzenie	Podłoże mikrobiologiczne	Czas inkubacji	Typ matrycy	Biblioteka widm referencyjnych	Liczba testowanych szczepów	Odsetek identyfikacji	Piśmiennictwo
MALDI Biotyper	Różne podłoża	3 dni	CCA	ML + 9 izolatów klinicznych i 4 referencyjne gatunki (9 różnych gatunków)	192 izolatów klinicznych (100 zidentyfikowanych metodami konwencjonalnymi)	ML – 4,7% S-ML – 36,8%	[50]
	Sabouraud	3 dni	CCA	własna – 48 izolatów klinicznych (17 gatunków)	133 izolatów klinicznych	97,8%	[32]
	Sabouraud	3 dni	CCA	ML + 10 referencyjnych szczepów (9 gatunków)	115 izolatów klinicznych i 11 szczepów referencyjnych	ML – 13,5% S-ML – 31%	[31]
	Sabouraud + chloramfenikol	3–14 dni	CCA	195 szczepów referencyjnych i 58 gatunków (pochodzące z kolekcji BCCM/IHEM i jeden izolat kliniczny)	176 izolatów klinicznych	40–100%	[42]
	Sabouraud + chloramfenikol	21 dni	CCA	ML + 13 referencyjnych szczepów (10 gatunków) i 11 izolatów klinicznych (8 gatunków)	64 izolaty kliniczne	brak oceny wydajności	[9]
Axima@ Sarantis	Różne podłoża	28 dni	DHB	18 gatunków referencyjnych (brak informacji o liczbie szczepów)	20 izolatów klinicznych	99,9%	[12]
	Sabouraud	7–21 dni	DHB	285 szczepów (21 gatunków)	285 szczepów (brak informacji czy wszystkie szczepy to izolaty kliniczne)	99,3%	[39]
	Sabouraud + gentamycyna i chloramfenikol	3 dni	CCA	108 szczepów referencyjnych (18 gatunków)	141 izolatów klinicznych (9 gatunków)	95,8%	[45]
Andromas	Sabouraud + antybiotyki	21 dni	CCA	50 izolatów klinicznych (12 gatunków)	381 izolaty kliniczne	91,9%	[2]
Vitek MS	Sabouraud + gentamycyna i chloramfenikol	5–10 dni	CCA	Vitek MS + 134 szczepy zidentyfikowane metodami konwencjonalnymi (17 gatunków)	131 izolaty kliniczne (13 gatunków)	88,5%	[45]

-TOF MS odbywa się poprzez porównanie kodu białkowego nieznanego organizmu z kodami referencyjnymi zawartymi w bibliotece [38]. W zależności od stopnia podobieństwa widma uzyskanego i widma referencyjnego, drobnoustrój jest identyfikowany do poziomu rodzaju, gatunku, podgatunku lub szczepu [33]. Obecny entuzjazm dla identyfikacji drobnoustrójów opartej na MALDI-TOF MS w rutynowym badaniu diagnostycznym jest podsycany przez możliwość uzyskania znacznie większej dokładności identyfikacji w porównaniu z konwencjonalnymi technikami fenotypowymi, przede wszystkim poprzez eliminację subiektywizmu oceny struktur morfologicznych grzyba przez laboranta, stosunkowo niskim jednostkowym kosztem analizy i szybkim czasem realizacji wyników wynoszącym zaledwie kilka minut dla pojedynczej próbki [5]. Przynajmniej kilka gotowych do użycia platform i zestawów MALDI-TOF do rutynowej identyfikacji mikroorganizmów jest obecnie dostępnych na rynku (Tabela I).

### 3. MALDI TOF MS w diagnostyce mykologicznej

Zastosowanie MALDI TOF MS do identyfikacji różnych ludzkich patogenów grzybowych jest szeroko opisywane w literaturze naukowej. Pierwsze opisy pochodzą z roku 2001, Amiri-Eliasi i Fenselau [4] opisują zastosowanie MALDI-TOF MS do identyfikacji jednokomórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Identyfikacja grzybów w laboratorium klinicznym oparta na MALDI-TOF MS ewoluuje jednak w wolniejszym tempie niż identyfikacja bakteryjna. Przełomowe badanie identyfikacji grzybów drożdżopodobnych w warunkach laboratoryjnych opublikowano dopiero w 2009 roku [36]. Z kolei opracowanie procedury MALDI-TOF MS do identyfikacji grzybów strzępkowych wymagało dalszych kilku lat [8, 44]. Trudności te spowodowane były naturalną złożonością biologiczną grzybów strzępkowych, czego przykładem jest jednoczesna obecność różnych ich struktur (strzępek i/lub konidiów) w tej

samej kulturze, co utrudnia identyfikację [48]. Dermatofity nie są wyjątkiem od tej reguły. Ponadto, drobnoustroje te rosną bardzo wolno i niejednokrotnie wytwarzają pigmenty, które zakłócają odczyt widma białkowego [22]. Wydajność identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF MS znajduje się w przedziale między 13,5 a 100% w zależności od przeprowadzonego badania (Tabela I).

#### 4. Czynniki krytyczne w identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF

Wiarygodność identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF MS uwarunkowana jest licznymi czynnikami krytycznymi związanymi przede wszystkim z rutynowymi procedurami laboratoryjnymi, w tym rodzajem zastosowanego podłoża hodowlanego, czasem inkubacji, techniką ekstrakcji białka, typem urządzeniem używanego do spektrometrii masowej i wersją stosowanej biblioteki widm referencyjnych.

##### 4.1. Wpływ stosowanego podłoża mikrobiologicznego

Wiarygodna identyfikacja gatunkowa dermatofitów za pomocą MALDI-TOF MS powinna być możliwa niezależnie od zastosowanych warunków hodowli *in vitro*. Niemniej jednak warunki hodowli mają istotny wpływ na fizjologię grzyba i profil ekspresji białek, stąd domniemanie, że uzyskiwane w MALDI-TOF MS widma białkowe zależne są od rodzaju podłoża hodowlanego i czasu prowadzenia inkubacji [32, 38]. Wnioski z przeprowadzonych badań wskazują jednak, że warunki hodowli nie wpływają na końcowy wynik identyfikacji za pomocą MALDI-TOF MS zarówno w przypadku diagnostyki patogenów bakteryjnych, jak i dermatofitów [6, 12, 32, 43, 50]. Na szczególną uwagę zasługują badania przeprowadzone przez Theel i in. [50], którzy po analizie izolatów klinicznych 5 gatunków dermatofitów hodowanych na 6 różnych podłożach mykologicznych, tj. na podstawowym agarze odżywczym, agarze czekoladowym, podłożu hamującym wzrost pleśni, podłożu DTM (Dermatophyte Test Medium), podłożu Mycosel i podłożu Sabourauda, nie znaleźli dowodów na to, że rodzaj pożywki wpływa na identyfikację gatunkową.

##### 4.2. Wpływ czasu inkubacji

Izolacja dermatofitów z próbek dermatologicznych i ich hodowla wykonywane są na podłożach mikrobiologicznych przeznaczonych specjalnie dla tej grupy grzybów, np. na podłożu DTM. Zależnie od czasu prowadzenia inkubacji, dermatofity stopniowo rozwijają

określone cechy makroskopowe i mikroskopowe, stanowiące późniejszy wyznacznik identyfikacyjny w konwencjonalnym badaniu diagnostycznym [22]. Początkowo następuje wzrost wegetatywnej części grzyba, tzw. strzępek, które w określonym stadium fizjologicznym umożliwiają wytwarzanie elementów rozrodczych, tzw. spor [35]. Zróznicowaniu etapów wzrostu dermatofitów towarzyszy modyfikacja składu ich ściany komórkowej, co wiąże się z ryzykiem uzyskania różnych profili białkowych za pośrednictwem MALDI-TOF MS w zależności od wieku hodowli [33]. Według różnych badań naukowych czas inkubacji dermatofitów przed ekstrakcją białek powinien wynosić od 3 dni do 3 tygodni, w tym okresie nie są notowane żadne wyraźne różnice w widmach białkowych, a uzyskiwane wyniki identyfikacji są tożsame [33, 50]. De Respini i in. [45] twierdzą, że czas inkubacji kultury dermatofitów wynoszący 10 dni jest optymalny dla uzyskania wiarygodnych wyników identyfikacji. Natomiast Packeu i in. [42] wskazują, że dokładność identyfikacji gatunkowej dermatofitów, aż do 100% korelacji z badaniem konwencjonalnym, zwiększa się wraz z wydłużonym czasem inkubacji z trzech do 14 dni. Z doświadczeń własnych wynika natomiast, że identyfikacja dermatofitów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS jest możliwa przed pojawieniem się diagnostycznych cech morfologicznych tych drobnoustrojów. Należy nadmienić, że zgodnie z obecnymi standardami wykonywania konwencjonalnych badań diagnostycznych w mykologii, czas inkubacji niezbędny do wykonania oceny makro- i mikroskopowej dermatofitów wynosi od 14 do 21 dni [14]. Zatem, MALDI-TOF MS skraca czas do uzyskania wyniku identyfikacji.

##### 4.3. Wpływ procedury ekstrakcji białek i przygotowania matrycy

Procedury identyfikacji dermatofitów oparte na metodzie MALDI-TOF MS zostały opisane przez liczne zespoły badawcze (Tabela I). Bezpośrednia identyfikacja nienaruszonych komórek lub zarodników jest najprostszym podejściem metodycznym [9]. Niemniej jednak dla grzybów strzępkowych, których komórki są trudne do lizy, przed wykonaniem analizy MALDI-TOF MS wymagana jest wstępna ekstrakcja białek przy użyciu kwaśnych rozpuszczalników lub rozerwanie komórek za pomocą specjalnych kulek [26]. Komórki grzybów mają znacznie większe rozmiary niż komórki bakteryjne, a dodatkowo okrywa je sztywna ściana komórkowa. Ściana komórkowa grzybów, w tym dermatofitów, zbudowana jest przede wszystkim z polisacharydów, tj. chityny,  $\beta$ -glukanów, mannanów, galaktomannanów, arabinogalaktanów, ramnomannanów, a zawartość białek, lipidów i polifosforanów jest znacznie mniejsza. Ten szczególny skład chemiczny, który

różni się od składu ściany bakteryjnej, częściowo wyjaśnienia potrzebę wstępnej analizy ekstrakcji białek, która uwalnia białka będące przedmiotem zainteresowania w celu wygenerowania profilu MALDI-TOF MS [33]. W przypadku dermatofitów, rozwój procedur identyfikacji nienaruszonych komórek grzybowych metodą MALDI-TOF MS rozpoczął się około 2000 roku od przełomowych badań Welham i in. [53], którzy protokół analizy całych komórek opracowany dla identyfikacji bakterii implementowali do identyfikacji *Penicillium* spp., *Scytalidium dimidiatum* i *T. rubrum*. Z zastosowaniem tego samego protokołu badania, Packeu i in. [42] osiągnęli mniej niż 40% powtarzalnych identyfikacji po 3 dniach hodowli. Dodatkowo, dla próbek o niewiarygodnej identyfikacji, izolaty analizowano ponownie po siedmiu i 14 dniach inkubacji oraz ekstrakcji kwasem mrówkowym z acetonitrylem, co dawało wynik 100% wiarygodnych identyfikacji [42].

W metodzie MALDI-TOF MS jonizacja laserowa pozwala na oddzielenie cząsteczek, także o dużych rozmiarach molekularnych, niskiej lotności i wrażliwych na ciepło bez ich degradacji [33]. W efekcie, technika MALDI-TOF MS umożliwia wykrywanie delikatnych biocząsteczek, takich jak peptydy, białka i glikoproteiny [38]. W różnych aplikacjach MALDI-TOF MS zastosowane są odmienne substancje matrycowe, co ma istotne znaczenie ze względu na osadzenie próbek w matrycy przed ich jonizacją [33]. Matryce jonowe są szeroko stosowane w protokołach identyfikacji drobnoustrojów i składają się z równo-molowych mieszanin konwencjonalnych związków matrycowych MALDI, takich jak kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB), kwas alfa-cyano-4-hydroksycynamonowy (CCA) lub kwas sinapinowy (SA) razem z zasadami organicznymi, w tym z pirydyną (Py), tributylaminą (TBA) lub N, N-dimetyloetylenodiaminą (DMED) [9, 38, 51]. CCA jest obecnie najczęściej stosowaną i zalecaną matrycą do identyfikacji dermatofitów, chociaż w dwóch przełomowych badaniach posłużono się DHB [9, 12].

#### 4.4. Wpływ stosowanych urządzeń do spektrometrii masowej

Na rynku dostępne są obecnie trzy różne platformy identyfikacji MALDI-TOF MS, przystosowane do rutynowej identyfikacji grzybów: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy), VitekMS (Bio-Merieux, Craaponne, Francja) i Andromas (Andromas SAS, Paryż, Francja). Dodatkowo, czwarta platforma produkowana przez Axima@Saramis, która została pierwotnie opracowana przez AnagnosTec (Poczdnam, Niemcy), jest również wyposażona w przyrządowanie Vitek MS do analizy widm.

Systemy te różnią się przede wszystkim sposobem przetwarzania widm, algorytmami stosowanymi do

tworzenia profilu białkowego oraz używanymi do porównywania i wyrażania podobieństwa między badanym widmem a widmami referencyjnymi [7]. Istotnym ograniczeniem tych systemów w przypadku identyfikacji dermatofitów jest fakt, że dostępne komercyjnie biblioteki są niewystarczające do rutynowego użytku w laboratorium klinicznym [33]. Wysokie wskaźniki identyfikacji, które są prezentowane w cytowanych badaniach naukowych, uzyskano dzięki wdrożeniu baz danych z wewnętrznymi bibliotekami widm odniesienia. Użyteczną opcją dostępnych platform jest właśnie możliwość elastycznego (na podstawie opracowań własnych) konstruowania biblioteki widm referencyjnych. Dwa najbardziej elastyczne systemy, MALDI Biotyper i Andromas, oferują możliwość wykorzystania tzw. średniej informacji widmowej, dzięki nakładaniu widm pochodzących od różnych szczepów tego samego gatunku [7]. Pozwala to znacznie precyzyjniej określić widmo referencyjne bądź wskazać możliwe rozbieżności w profilach uzyskiwanych dla jednego gatunku grzyba.

#### 4.5. Wpływ biblioteki widm referencyjnych

W 2008 roku Erhard i in. [12] po teście techniki MALDI-TOF MS na izolatach klinicznych dermatofitów, potwierdzonym przy użyciu konwencjonalnej identyfikacji morfologicznej i sekwencjonowania regionu ITS (Internal Transcribed Spacer), wysunęli wnioski, że identyfikacja za pomocą tej techniki umożliwia 99,9% stopień ufności dla identyfikacji dermatofitów sklasyfikowanych w gatunkach *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* i *Arthroderma benhamiae*. Wyniki te badacze uzyskali przy użyciu własnej biblioteki widm referencyjnych, wyeksportowanej później do pakietu oprogramowania SARAMIS (AnagnosTec). Nenoff i in. [39] dokonali następnie oceny tej biblioteki widm referencyjnych w badaniu identyfikacyjnym 285 izolatów dermatofitów. Uzyskane wyniki wykazały 99,3% zgodność z wynikami identyfikacji opartymi o analizę DNA. Podobną dokładność identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF MS sięgającą 91,9% uzyskali Alshawa i in. [2] w badaniu przeprowadzonym na 360 izolatach klinicznych należących do siedmiu różnych gatunków przy użyciu systemu Andromas. Po opublikowaniu wyników tych badań stało się jednak jasne, że jednym z głównych ograniczeń identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF MS jest jakość biblioteki widm referencyjnych. Uzyskiwane wyniki identyfikacji różniły się znacznie w zależności od tego, czy zostały uzyskane przy użyciu standardowej biblioteki producenta (ML), czy z biblioteki uzupełnionej przez badaczy (S-ML). Uzupełnienie biblioteki widm referencyjnych jest zatem konieczne do dokładnej i wiarygodnej identyfikacji dermatofitów w oparciu

o MALDI-TOF MS. W rzeczywistości, we wszystkich badaniach oceniających MALDI-TOF MS w celu identyfikacji dermatofitów wykorzystano własną bibliotekę referencyjną, podkreślając w ten sposób poważne ograniczenie dostępnych na rynku bibliotek widm referencyjnych [2, 39]. Ponadto, identyfikacja gatunkowa dermatofitów w dużym stopniu zależna jest od liczby dodatkowych widm szczepów referencyjnych w bibliotece dla danego gatunku [33]. Przykładowo, Theel i in. [50] poprawnie zidentyfikowali tylko 4,7% i 36,8% spośród 171 izolatów klinicznych dermatofitów, stosując odpowiednio ML i S-ML. Karabıcak i in. [31] w badaniu identyfikacyjnym 115 izolatów i 11 szczepów referencyjnych dermatofitów uzyskali wskaźnik wiarygodnych identyfikacji wynoszący 13,5% w porównaniu z 31% przy użyciu odpowiednio biblioteki ML i S-ML w systemie opracowanym przez Bruker Daltonics. De Respinis i in. [45] ocenili wydajność systemu Vitek MS Plus do identyfikacji dermatofitów. W pierwszym etapie badania zastosowano 134 zidentyfikowane izolaty dermatofitów, w celu rozszerzenia biblioteki widm referencyjnych producenta, która została następnie zweryfikowana przy użyciu 131 izolatów klinicznych. Korzystając z biblioteki S-ML, autorzy dokładnie zidentyfikowali 95,4% szczepów.

Ponadto, wydajność systemu identyfikacji MALDI-TOF MS może zostać poprawiona przy zastosowaniu odpowiedniego algorytmu logarytmicznego. Theel i in. [50] poprawnie zidentyfikowali 36,8% i 59,6% spośród 171 izolatów klinicznych dermatofitów, stosując odpowiednio próg oceny logarytmicznej producenta (tj. 2,0) i próg redukcji logarytmicznej obniżony do wartości 1,7. Podobnie Karabıcak i in. [31] poprawili poziom identyfikacji z 31% do 89,7% poprzez obniżenie progu logarytmicznego wyniku z 2,0 do 1,7.

#### 4.6. Wpływ algorytmu porównywania widm

Literatura dotycząca architektury wewnętrznej bibliotek widm referencyjnych do identyfikacji dermatofitów za pomocą MALDI-TOF MS jest wciąż niewystarczająca. W swoich badaniach Theel i in. [50] oraz Karabıcak i in. [31] opracowali bibliotekę poprzez nakrapianie inokulum szczepów referencyjnych dermatofitów na osiem pojedynczych studzienek płytki MALDI-TOF MS, a widma zebrali z trzech powtórzeń doświadczenia, uzyskując w sumie 24 widma dla izolatu. Te badania pozwoliły ocenić architekturę uzyskanych bibliotek widm referencyjnych dermatofitów. Wnioski z cytowanych badań pozwoliły wprowadzić zalecenie dotyczące rozwiązywania problemów związanych z heterogenicznością gatunków drobnoustrojów, które jest jedynie rekomendacją zwiększenia liczby widm referencyjnych dla różnych szczepów danego gatunku w bibliotece. Wnioski te potwierdzili w swoich bada-

niach Normand i in. [41] wskazując, że zwiększenie liczby widm masowych generowanych z różnych subkultur danego szczepu zapewnia znaczną poprawę identyfikacji grzybów strzępkowych w metodzie MALDI-TOF MS. Takie podejście do budowania biblioteki widm referencyjnych może również częściowo rozwiązać problem stosunkowo rzadkich gatunków, dla których liczba dostępnych szczepów jest niewystarczająca do zbudowania szerokich bibliotek spektralnych [33].

#### 4.7. Wpływ zmian taksonomicznych

Problemy związane z identyfikacją dermatofitów są często zgłaszane, nie tylko przy prowadzeniu identyfikacji metodami MALDI-TOF MS. W badaniach Theel i in. [50], jeden izolat *Microsporum canis* zidentyfikowano jako *M. audouinii*, jeden izolat *Trichophyton mentagrophytes* zidentyfikowano jako *T. tonsurans*, a 16 izolatów *T. rubrum* zidentyfikowano jako *T. soudanense*. Natomiast Erhard i in. [12] zidentyfikowali jeden izolat *T. rubrum*, który jednocześnie wykazywał kilka elementów widma masowego, które były typowe dla *T. violaceum*. Trudności w identyfikacji szczepów *T. violaceum* za pomocą metody MALDI-TOF MS zostały zaobserwowane również w innych badaniach; naukowcy powiązali te błędy z bliskim podobieństwem morfologicznym między *T. rubrum* i *T. violaceum* [32]. De Respinis i in. [45] wykazali, że tylko 47% szczepów z afrykańskiej kolekcji *T. rubrum* (tj. *T. soudanense*) zostało poprawnie zidentyfikowanych, a wiele określonych zostało jako *T. violaceum*.

Problemy częściowego braku korelacji między genotypami grzybów i odpowiadającymi im fenotypami spowodowały debatę wśród mykologów, szczególnie dotyczącą definicji „gatunków dermatofitów” i klasyfikacji taksonomicznej zaproponowanej przez de Hoog i in. [28]. Niektóre biotypy, które na podstawie znacznych różnic w morfologii i ogólnie przyjętego schematu diagnostycznego, zostały uznane za odrębne gatunki, są obecnie konsekwentnie uważane za synonimy zgodnie z filogenezą opartą na DNA i analizami genetycznymi populacji [21, 22]. W szczególności, kosmopolityczny dermatofit *T. rubrum* i endemiczny afrykański czynnik etiologiczny *tinea capitis* u dzieci, *T. soudanense*, są nierozróżnialne przy użyciu uniwersalnego markera molekularnego identyfikacji, tj. cząsteczki ITS [24]. Dodatkowo, *T. rubrum* kompleks składający się z dwóch gatunków antropofilnych, *T. rubrum* i *T. violaceum* [22]. Błędna identyfikacja między *T. rubrum*, *T. soudanense* i *T. violaceum* w różnych badaniach klinicznych przy użyciu odrębnych bibliotek widm referencyjnych MALDI-TOF MS wskazuje, że identyfikacja MALDI-TOF MS jest ograniczona obecnym złotym standardem identyfikacji dla danego taksonu [15, 28, 33]. W szczególności, ograniczona odległość genetyczna

obserwowana na podstawie sekwencji ITS między *T. soudanense* i *T. violaceum* rodzi pytanie o ich uznanie za odrębne gatunki [22]. Ponadto, analiza widm masowych MALDI-TOF MS izolatów dermatofitów kompleksu *T. rubrum* uwypukla niejednorodność widm wśród izolatów *T. rubrum* i względne podobieństwo między izolatami *T. violaceum* i *T. soudanense* [33]. Podobnie, obecna stosunkowo niska rozdzielczość taksonomiczna dotycząca kompleksu gatunków *T. mentagrophytes* utrudnia również dokładną identyfikację gatunków na podstawie widm referencyjnych MALDI-TOF MS [44]. Profile białkowe MALDI-TOF MS izolatów klasyfikowanych w tym kompleksie różnią się od profili izolatów *T. rubrum*, ale są stosunkowo niejednorodne wśród gatunków tego kompleksu [33]. Co więcej, główne piki widm masowych *T. tonsurans* są również obecne w widmie *T. interdigitale* [9].

Opisane zawłości taksonomiczne skutkują niejednoznacznością widm referencyjnych w bibliotece i niejednokrotnie prowadzą do niewiarygodnych wyników identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF. Identyfikacja dermatofitów na podstawie MALDI-TOF MS wymaga zatem niezawodnych i wyselekcjonowanych bibliotek referencyjnych, w tym widm zebranych z izolatów lub szczepów zidentyfikowanych na poziomie gatunku [33, 38, 41]. Obecny „złoty standard” identyfikacji dermatofitów stanowi analiza sekwencji ITS [17–20, 29, 34]. Ważne jest jednak zaktualizowanie baz danych o inne sekwencje DNA dermatofitów, aby aktualna definicja gatunku dermatofitów stała się zgodna z podejściem wielokierunkowym [22, 28].

### 5. Perspektywy rozwoju MALDI-TOF MS w diagnostyce mykologicznej

Metoda MALDI-TOF MS jest istotnym postępowaniem technicznym w diagnostyce mykologicznej i stanowi alternatywę dla czasochłonnej i pracochłonnej identyfikacji dermatofitów opartej o cechy morfologiczne oraz sekwencjonowanie DNA [15]. Technika ta jest w mniejszym stopniu zależna od wpływu zmiany rutynowych klinicznych procedur laboratoryjnych, takich jak pożywka hodowlana i czas inkubacji, niż metod opartych na hodowli dermatofitów. W tym aspekcie, ograniczeniem stosowania identyfikacji na podstawie widm uzyskanych w metodzie MALDI-TOF MS jest zanieczyszczenie próbki pożywką hodowlaną, szczególnie gdy kolonii grzybów nie można oddzielić od agaru [33]. Niemniej jednak, głównym ograniczeniem tej techniki pozostaje niewystarczająca reprezentacja gatunków dermatofitów w referencyjnych bibliotekach widmowych obecnie dostępnych na rynku systemów identyfikacji MALDI-TOF MS. Laboratoria mają możliwość rozszerzenia biblioteki widm referencyjnych produ-

centa za pomocą własnej biblioteki referencyjnej w celu uwzględnienia między- i wewnątrzsoistej różnorodności dermatofitów, co jednak wymaga wykwalifikowanych mykologów i jest możliwe tylko w nielicznych ośrodkach na świecie z dostępem do tej technologii [37]. Ciekawym pomysłem wydaje się być umieszczenie własnych baz widm referencyjnych MALDI-TOF MS w sieci i umożliwienie wzajemnego korzystania z nich przez różne laboratoria kliniczne [37]. Obecnie dostępne na rynku rozwiązania do identyfikacji dermatofitów metodą MALDI-TOF MS posiadają zbyt wąskie zakresy bibliotek referencyjnych i w najbliższej przyszłości nie można spodziewać się znacznej poprawy, zatem opracowanie internetowej biblioteki referencyjnej widm MALDI-TOF MS wyspecjalizowanej do identyfikacji grzybów i odpowiednio zweryfikowanej przez ekspertów mykologów stanowiłoby interesujące przedsięwzięcie. Taka platforma mogłaby umożliwić naukowcom i diagnostom na całym świecie wyszukiwanie w Internecie gatunków w podobny sposób, który jest obecnie dostępny do identyfikacji sekwencji kwasów nukleinowych [33].

Obecnie identyfikacja dermatofitów techniką MALDI-TOF MS wymaga uzyskania wzrostu hodowli grzyba z próbki materiału klinicznego. Jednak, nawet gdy próbki pobrane są prawidłowo, hodowle dermatofitów wykazują stosunkowo niską czułość, dając około 30% wyników fałszywie ujemnych [1, 25, 46]. Jak wskazali Hollemeyer i in., obiecującym przyszłym zastosowaniem techniki MALDI-TOF MS będzie bezpośrednia identyfikacja dermatofitów z próbek klinicznych [27]. Opisana przez tych badaczy procedura jest szybka i nie wymaga etapu wstępnej hodowli dermatofitów. Opublikowane wyniki wskazują, że widma masowe z bezpośredniej analizy techniką MALDI-TOF MS próbek paznokci zainfekowanych *T. rubrum* są zdecydowanie odmienne od widm uzyskanych od zdrowych osób, bądź pacjentów cierpiących na inne choroby skóry, np. łuszczycę. Według Hollemeyera i in. [27] specyficzny profil białkowy próbek zakażonych *T. rubrum* można wyjaśnić zjawiskiem stopniowej degradacji białek strukturalnych paznokcia podczas postępu infekcji grzybiczej. W ten sposób białka te nie zakłócają uzyskania widma identyfikacyjnego patogenu grzybiczego.

### 6. Podsumowanie

Metoda MALDI-TOF MS jest stosunkowo nowym narzędziem służącym do identyfikacji drobnoustrojów, w tym dermatofitów. Technika jest szybsza, prostsza i wydajniejsza w porównaniu z konwencjonalnymi metodami identyfikacji dermatofitów. Niemniej jednak metoda MALDI-TOF MS w diagnostyce mykologicznej dermatofitów jest wciąż wyłącznie narzędziem badaw-



czy, a laboratoria używające tej techniki rutynowo są pionierami. Podstawowymi ograniczeniami szerokiego wdrożenia MALDI-TOF MS są zbyt wolno rozwijane biblioteki widm referencyjnych dermatofitów, co niejednokrotnie prowadzi do błędnej identyfikacji lub braku identyfikacji, a także niewielka liczba procedur analizy bezpośredniej z próbek dermatologicznych. Ograniczenie to wydaje się istotne, zwłaszcza, że aż 30% mikroskopowo dodatnich prób jest ujemnych w badaniu hodowlanym z powodu samooleczenia pacjenta przed wizytą u dermatologa, a brak hodowli uniemożliwia identyfikację techniką MALDI-TOF MS. Ponadto, z tego samego powodu nie jest możliwe monitorowanie terapii. W tym kontekście molekularne podejście identyfikacyjne wciąż wydaje się być krok naprzód.

## Piśmiennictwo

- Afshar P, Vahedi L, Rouhanizadeh H.: A comparison of conventional rapid methods in diagnosis of superficial and cutaneous mycoses based on KOH, Chicago sky blue 6B and calcofluor white stains. *Iran. J. Microbiol.* **10**, (2019)
- Alshawa K., Beretti J.L., Lacroix C., Feuilhade M., Dauphin B., Quesne G., Hassouni N., Nassif X., Bougnoux M.E.: Successful identification of clinical dermatophyte and Neoscytalidium species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2277–2281 (2012)
- Aluyi H.A., Drucker D.B.: Fingerprinting of carbohydrates of *Streptococcus mutans* by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **178**, 209–218 (1979)
- Amiri-Eliasi B., Fenselau C.: Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal. Chem.* **73**, 5228–5231 (2001)
- Azrad M., Keness Y., Nitzan O., Pastukh N., Tkhawkho L., Freidus V., Peretz A.: Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect. Dis.* **19**, 72 (2019)
- Carbonnelle E., Beretti J.L., Cottyn S., Quesne G., Berche P., Nassif X., Ferroni A.: Rapid identification of *Staphylococci* isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2156–2161 (2007)
- Cassagne C., Normand A.C., L'Ollivier C., Ranque S., Piarroux R.: Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*, **59**, 678–690 (2016)
- Cassagne C., Ranque S., Normand A.C., Fourquet P., Thiebault S., Planard C., Hendrickx M., Piarroux R.: Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One*, **6**, e28425 (2011)
- Chalupova J., Raus M., Sedlarova M., Sebela M.: Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol. Adv.* **32**, 230–241 (2014)
- da Cunha K.C., Riat A., Normand A.C., Bosshard P.P., de Almeida M.T.G., Piarroux R., Schrenzel J., Fontao L.: Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. *Mycoses*, **61**, 691–697 (2018)
- Effendy I., Lecha M., Feuilhade de Chauvin M., Di Chiacchio N., Baran R.: Epidemiology and clinical classification of onychomycosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **19**, 8–12 (2005)
- Erhard M., Hippler U.C., Burmester A., Brakhage A.A., Wostemeyer J.: Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp. Dermatol.* **17**, 356–361 (2008)
- Fagerquist C.K., Garbus B.R., Miller W.G., Williams K.E., Yee E., Bates A.H., Boyle S., Harden L.A., Cooley M.B., Mandrell R.E.: Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Anal. Chem.* **82**, 2717–2725 (2010)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A.: Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. *J. Appl. Microbiol.* **29**, 212–232 (2020)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Molekularne metody diagnostyki dermatomykoz – przegląd dostępnych technik oraz ocena ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania. *Adv. Microbiol.* **58**, 483–494 (2019)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953 (2018)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: The host range of dermatophytes, it is at all possible? Phenotypic evaluation of the keratinolytic activity of *Trichophyton verrucosum* clinical isolates. *Mycoses*, **62**, 274–283 (2019)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zięba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180 (2019)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Adv. Microbiol.* **58**, 49–58 (2019)
- Gräser Y.: Species Identification of Dermatophytes by MALDI-TOF MS. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **8**, 193–197 (2014)
- Graser Y., Scott J., Summerbell R.: The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia*, **166**, 239–256 (2008)
- Hay R.J.: 268 – Dermatophytosis (Ringworm) and Other Superficial Mycoses. W: red.: J.E. Bennett, R. Dolin, M.J.B.T.M. Blaser Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition). Content Repository Only!, Philadelphia 2015, 2985–2994.e1
- Hettick J.M., Green B.J., Buskirk A.D., Kashon M.L., Slaven J.E., Janotka E., Blachere F.M., Schmechel D., Beezhold D.H.: Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 2555–2560 (2008)
- Hollemeier K., Jager S., Altmeyer W., Heinze E.: Proteolytic peptide patterns as indicators for fungal infections and nonfungal affections of human nails measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **338**, 326–331 (2005)
- de Hoog G.S., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J.B., Freete J., Goker M.,

- Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Graser Y.: Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017)
29. Irinyi L., Serena C., Garcia-Hermoso D., Arabatzis M., Desnos-Ollivier M., Vu D., Cardinali G., Arthur I., Normand A.C., Giraldo A., da Cunha K.C., Sandoval-Denis M., Hendrickx M., Nishikaku A.S., de Azevedo Melo A.S. i wsp.: International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database – the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **53**, 313–337 (2015)
  30. Kanbe T.: Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, **166**, 307–317 (2008)
  31. Karabıcak N., Karatuna O., Ilkit M., Akyar I.: Evaluation of the Bruker Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) System for the Identification of Clinically Important Dermatophyte Species. *Mycopathologia*, **180**, 165–171 (2015)
  32. L'Ollivier C., Cassagne C., Normand A.C., Bouchara J.P., Contet-Audonneau N., Hendrickx M., Fourquet P., Coulibaly O., Piarroux R., Ranque S.: A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med. Mycol.* **51**, 713–720 (2013)
  33. L'Ollivier C., Ranque S.: MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia*, **182**, 183–192 (2017)
  34. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościarczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health*, **66**, 982–989 (2019)
  35. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. *Adv. Microbiol.* **58**, 165–176 (2019)
  36. Marklein G., Josten M., Klanke U., Muller E., Horre R., Maier T., Wenzel T., Kostrzewa M., Bierbaum G., Hoerauf A., Sahl H.G.: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2912–2917 (2009)
  37. Martiny D., Bart A., Vandenberg O., Verhaar N., Wentink-Bonnema E., Moens C., van Gool T.: Subtype determination of *Blastocystis* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 529–536 (2014)
  38. Murray P.R.: What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* **14**, 419–423 (2012)
  39. Nenoff P., Erhard M., Simon J.C., Muylowa G.K., Herrmann J., Rataj W., Gräser Y.: MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med. Mycol.* **51**, 17–24 (2013)
  40. Normand A.C., Becker P., Gabriel F., Cassagne C., Accocceberry I., Gari-Toussaint M., Hasseine L., De Geyter D., Pierard D., Surmont I., Djenad E., Donnadieu J.L., Piarroux M., Ranque S., Hendrickx M. i wsp.: Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2661–2670 (2017)
  41. Normand A.C., Cassagne C., Ranque S., L'Ollivier C., Fourquet P., Roesems S., Hendrickx M., Piarroux R.: Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol.* **13**, 76 (2013)
  42. Packeu A., De Bel A., l'Ollivier C., Ranque S., Detandt M., Hendrickx M.: Fast and accurate identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: validation in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 3440–3443 (2014)
  43. Pennanec X., Dufour A., Haras D., Réhel K.: A quick and easy method to identify bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 384–392 (2010)
  44. Ranque S., Normand A.C., Cassagne C., Murat J.B., Bourgeois N., Dalle F., Gari-Toussaint M., Fourquet P., Hendrickx M., Piarroux R.: MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses*, **57**, 135–140 (2014)
  45. De Respinis S., Monnin V., Girard V., Welker M., Arzac M., Celliere B., Durand G., Bosshard P.P., Farina C., Passera M., Van Belkum A., Petrini O., Tonolla M.: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 4286–4292 (2014)
  46. Robert R., Pihet M.: Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, **166**, 295–306 (2008)
  47. Rudramurthy S., Shaw D.: Overview and update on the laboratory diagnosis of dermatophytosis. *Clin. Dermatology Rev.* **1**, 3–11 (2017)
  48. Santos C., Paterson R.R.M., Venâncio A., Lima N.: Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 375–385 (2010)
  49. Tartor Y.H., Abo Hashem M.E., Enany S.: Towards a rapid identification and a novel proteomic analysis for dermatophytes from human and animal dermatophytosis. *Mycoses*, **62**, 1116–1126 (2019)
  50. Theel E.S., Hall L., Mandrekar J., Wengenack N.L.: Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4067–4071 (2011)
  51. Tholey A., Heinzle E.: Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 24–37 (2006)
  52. Verrier J., Monod M.: Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia*, **182**, 193–202 (2017)
  53. Welham K.J., Domin M.A., Johnson K., Jones L., Ashton D.S.: Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 307–310 (2000)