

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 579.841.11.083.18:543.42.062

Лопастейская Я.А.^{1,2}, Молчанова Е.В.^{1,2}, Шаров Т.Н.¹, Кузютина Ю.А.^{1,2}, Захарова И.Б.^{1,2}, Викторов Д.В.^{1,2}, Топорков А.В.^{1,2}

ПРИМЕНЕНИЕ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ (MALDI-TOF) ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград;

²ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», 400131, Волгоград, Российская Федерация

Представлены результаты разработанного методологического подхода к идентификации Burkholderia pseudomallei и Burkholderia mallei с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков. Оптимизирован протокол пробоподготовки культур возбудителей мелиоидоза и сапа с учетом особенностей соблюдения требований биологической безопасности для работ с ПБА II группы патогенности. Оценена зависимость качества масс-спектров (число индивидуальных пиков и их интенсивность) от среды культивирования микроорганизмов. Получены характеристические масс-спектры коллекционных штаммов B. pseudomallei (5) и B. mallei (5), сформирован набор референсных масс-спектров для идентификационной базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH.), с использованием которой проводилась идентификация 43 штаммов патогенных буркхольдерий. В результате продемонстрирована возможность достоверного определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов до видового уровня. Кластерный анализ полученных масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий продемонстрировал группирование исследованных штаммов в соответствии с их видовой принадлежностью. Пополненная база масс-спектральных характеристик в дальнейшем позволит проводить экспресс-идентификацию изолятов, подозрительных на принадлежность к возбудителям мелиоидоза и сапа, а также станет основой для разработки схем гемотипирования штаммов буркхольдерий методом масс-спектрометрии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; Burkholderia mallei, Burkholderia pseudomallei, MALDI-ToF-MS-идентификация.

Для цитирования: Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(8): 502-507. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507

Lopasteiskaya Ya.A.^{1,2}, Molchanova E.V.^{1,2}, Sharov T.N.¹, Kuziyutina Yu.A.^{1,2}, Zakharova I.B.^{1,2}, Victorov D.V.^{1,2}, Toporkov A.V.^{1,2}

THE APPLICATION OF TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY WITH MATRIX ACTIVATED LASER DESORPTION-IONIZATION (MALDI-TOF) FOR IDENTIFYING AGENTS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS

¹The Volgogradskii research anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 400132, Volgograd, Russia; ²The Volgogradskii state medical university, 400131 Volgograd, Russia

The article presents the results of application of developed methodological approach to identifying Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei using direct mass spectrometry profiling of cellular proteins. The protocol of sampling preparation of cultures of melioidosis and glanders was optimized with taking in account characteristics of observation of requirements of biological safety for operations with pathogenic biological agents of pathogenicity group II. The dependence of quality of mass spectrums (number of individual peaks and their intensity) from medium of fermentation of microorganisms was evaluated. The characteristic mass spectrums of collection strains B.pseudomallei (5) and B.mallei (5) were obtained. The set of reference mass-spectrums was generated for identification data base S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH.). The mentioned data base was used for identification of 43 strains of pathogenic Burkholderia. The opportunity of reliable identification of taxonomic belonging of examined microorganisms up to species' level. The cluster analysis of obtained mass-spectrums of common cellular proteins of collection strains of pathogenic Burkholderia demonstrated grouping of examined strains according to their species' belonging. The supplemented data base of mass-spectral characteristics hereinafter will permit applying express-identification of isolates suspicious for belonging to agents of melioidosis and glanders. The updated data base will become a basis for developing schemes of hemotyping of strains of Burkholderia using mass spectrometry technique.

Key words: mass spectrometry; MALDI-ToF-MS-identification; Burkholderia pseudomallei; Burkholderia mallei.

For citation: Lopasteiskaya Ya.A., Molchanova E.V., Sharov T.N., Kuziyutina Yu.A., Zakharova I.B., Victorov D.V., Toporkov A.V. The application of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption/ionization (MALDI-ToF) for identifying agents of glanders and melioidosis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (8): 502-507. (in Russ.) DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-8-502-507

For correspondence: Molchanova E.V., candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of collection strains. e-mail: elenakalinki@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 03.03.2016
Accepted 15.03.2016

Введение. Возбудители опасных инфекционных болезней — сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) — относятся к β -подклассу протеобактерий, семейству *Burkholderiaceae*, роду *Burkholderia*, включающему в настоящее время более 90 видов микроорганизмов и представляющему собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных и человека.

Мелиоидоз эндемичен для ряда стран Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия, Камбоджа, Вьетнам, Лаос, Мьянма, Гонконг, Тайвань, Сингапур), территорий южного Китая, Индостана, а также северной Австралии, Папуа — Новой Гвинеи, Западной и Центральной Африки, в западном полушарии — Пуэрто-Рико, Сальвадора, островов Карибского бассейна, стран Латинской Америки (Венесуэла, Бразилия, Эквадор), где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов [7]. Сап — зоонозная инфекционная болезнь, поражающая в естественных условиях преимущественно непарнокопытных животных (лошади, ослы, мулы, верблюды), а также представителей семейства кошачьих. В настоящее время сап животных регистрируется в Монголии, Турции, Иране, Ираке, странах Аравийского полуострова, Китае, Индии, Индонезии, на Филиппинах [12].

Тяжелое течение заболеваний, высокая летальность, отсутствие специфических средств профилактики выводят на первый план задачу адекватной и быстрой диагностики данных инфекций [2, 4, 8]. Необходимо также помнить, что возбудители мелиоидоза и сапа рассматриваются как потенциальные агенты биологического оружия и средства осуществления биотеррористических актов, что подчеркивает актуальность исследований, направленных на разработку и совершенствование методов их диагностики [3, 6].

Классическая схема идентификации патогенных буркхольдерий включает постановку ряда фенотипических тестов (культурально-морфологические, тинкториальные, биохимические свойства) и проведение генодиагностических исследований, что в целом требует до 72 ч с момента поступления первичного материала [4]. Внедряющиеся в практику лабораторных исследований новые автоматизированные методы микробиологического анализа позволяют существенно сократить время и повысить эффективность проведения диагностики.

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией является одним из таких методов [1, 2, 5, 8, 13]. Суть метода заключается в матрично-опосредованной ионизации клеточных белков исследуемого патогена с последующим определением отношения массы к заряду ионов; на основе этих данных формируются характерные спектры [9, 11]. Собранные в процессе анализа спектры исследуемых микроорганизмов сравнивают с референсными спектрами из электронной базы данных, используемой для автоматической идентификации [8]. Аналитическая чувствительность метода составляет 1000 КОЕ/мл [13]. В настоящее время наиболее распространены два аппаратно-программных комплекса для идентификации и биотипирования микроорганизмов с помощью масс-спектрометрии — MALDI Biotyper (Bruker, США) и S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH, Германия), основанные на использовании MALDI-ToF масс-спектрометров линейек MicroflexTM (Bruker) и AximaTM Confidence (Shimadzu, Япония) соответственно. Обе identifica-

ционные базы данных содержат масс-спектры порядка 5 тыс. видов микроорганизмов, включая мицелиальные грибы, дрожжи, грамотрицательные и грамположительные бактерии, но в них практически отсутствуют референсные масс-спектры возбудителей особо опасных инфекций.

В связи с этим, целями данного исследования являлись создание референтных белковых масс-спектров *B. pseudomallei* и *B. mallei* и апробация метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации для идентификации данных возбудителей.

Материал и методы. В исследовании использовали 43 штамма патогенных буркхольдерий дикого типа из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, из которых 11 — *B. mallei*, 32 — *B. pseudomallei*. Сведения об использованных штаммах приведены в табл. 1.

Штаммы выращивали на L-агаре (Difco, США) при температуре 37°C. 10 из них дополнительно культивировали на агаре на основе кислого гидролизата казеина (АГК), рН 6,8, при температуре 37°C. Из клеток 18-часовой агаровой культуры буркхольдерий готовили взвеси в 300 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Panseas, Испания) в микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл. Материал тщательно суспендировали для достижения максимально гомогенизированной взвеси. Затем в пробирки с препаратами добавляли по 900 мкл абсолютного этанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции центрифугировали 2 мин при 13 000 об/мин, удаляли супернатант, высушивали на воздухе. Далее в пробирки вносили по 50 мкл ацетонитрила и 70% раствора муравьиной кислоты, вновь перемешивали и наносили материал в объеме

Таблица 1

Сведения о штаммах *B. pseudomallei* и *B. mallei*, использованных в работе

Вид	Штаммы	Место выделения	Источник выделения
<i>B.pseudomallei</i>	1, 2	Вьетнам	больной человек
<i>B.pseudomallei</i>	Tchad 97, Niamay 99, Dalat 100, Crachat d, Iran 101, Shigan 102, PI 54 107	неизвестно	неизвестно
<i>B.pseudomallei</i>	Ward 108, Roos 109, Mahek 111, Mahen113, Coopek 112, Snider114	Австралия	больной человек
<i>B.pseudomallei</i>	Soil isolate 13 116	— " —	почва
<i>B.pseudomallei</i>	Goat isolate 17 117	— " —	больное животное
<i>B.pseudomallei</i>	125, 127, 130	неизвестно	неизвестно
<i>B.pseudomallei</i>	131, 134, 135, 137, 138, 139	Таиланд	больной человек
<i>B.pseudomallei</i>	C-141 (CIP 6068)	Сайгон	больной человек
<i>B.pseudomallei</i>	56770, 57582, 59437, 60631, 60839, 61503	Вьетнам	больной человек
<i>B.mallei</i>	10230	неизвестно	неизвестно
<i>B.mallei</i>	C-4, C-5	Монголия	больное животное
<i>B.mallei</i>	Иванович, Zagreb	Югославия	— " —
<i>B.mallei</i>	Будапешт	Венгрия	— " —
<i>B.mallei</i>	11	Польша	— " —
<i>B.mallei</i>	8, 5584	Россия	— " —
<i>B.mallei</i>	B-120	Улан-Удэ	— " —
<i>B.mallei</i>	Muksuvarum	Индия	— " —

Примечание. В общей сложности было определено 239 гаплотипов из 1831 потенциально возможного.

Таблица 2

Степень достоверности идентификации штаммов патогенных буркхольдери

Микроорганизмы	L-agar	АГК
32 штамма <i>B. pseudomallei</i>	> 76%	> 70%
11 штаммов <i>B. mallei</i>	> 76%	> 70%

1 мкл на лунки металлической мишени (чипа). На каждую пробу наносили по 1 мкл матрицы для MALDI-ToF (α -циано-гидроксикоричная кислота в растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трихлоруксусной кислоты, ТФК). После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру масс-анализатора. Клетки штамма *E. coli* CCUG 10979 использовали для калибровки прибора. Для получения одиночного масс-спектра использовали 100 импульсов лазера (частота 60 Гц); диапазон регистрации составлял 1000–20 000 m/z , фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных выстрелов. С каждой лунки чипа снимался спектр, представляющий собой сумму 6 одиночных спектров (600 импульсов лазера). Все масс-спектры регистрировали в линейном режиме, без использования рефлектрона.

Для формирования референсных спектров использовали 5 штаммов *B. mallei* и 5 штаммов *B. pseudomallei*, с 10-кратной повторностью по каждому из штаммов. При анализе результатов учитывались следующие характеристики масс-спектра: количество пиков, их интенсивность, общая величина шумового компонента. Результирующий спектр каждого

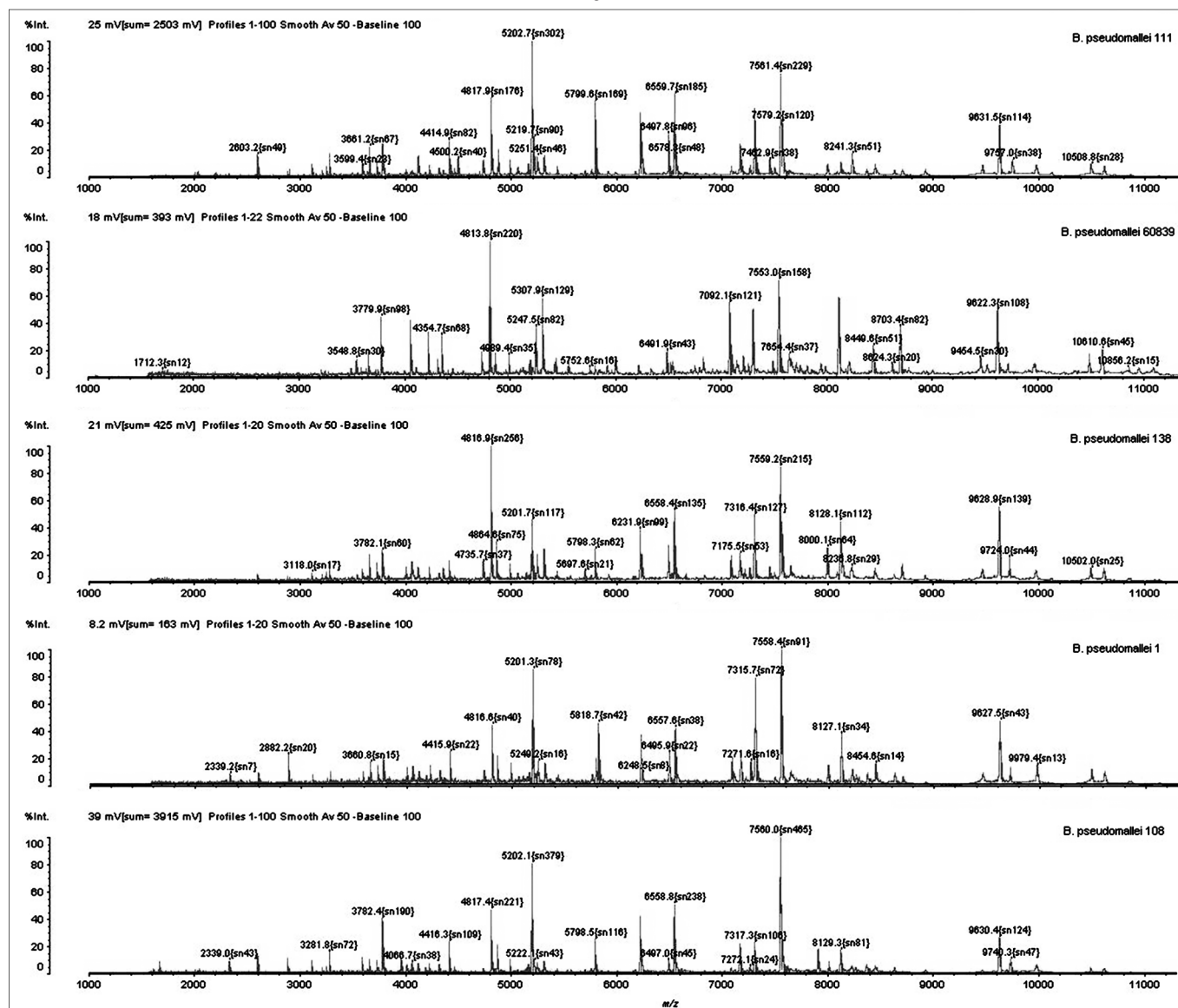
штамма экспортировали в базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM для последующего анализа.

Заключение о видовой или родовой принадлежности исследуемой культуры делали на основе сопоставления индивидуальных масс-спектров в режиме «Идентификация» с базой данных S.A.R.A.M.I.S.TM, дополненной полученными референсными спектрами. Корректная идентификация до вида достигалась при величинах показателя score $\geq 75\%$.

Кластерный анализ и построение дендрограмм осуществляли с использованием инструментов MALDI Biotyper.

Результаты и обсуждение. Поскольку на времяпрелетных масс-спектрометрах, включая используемый Axima

a



6

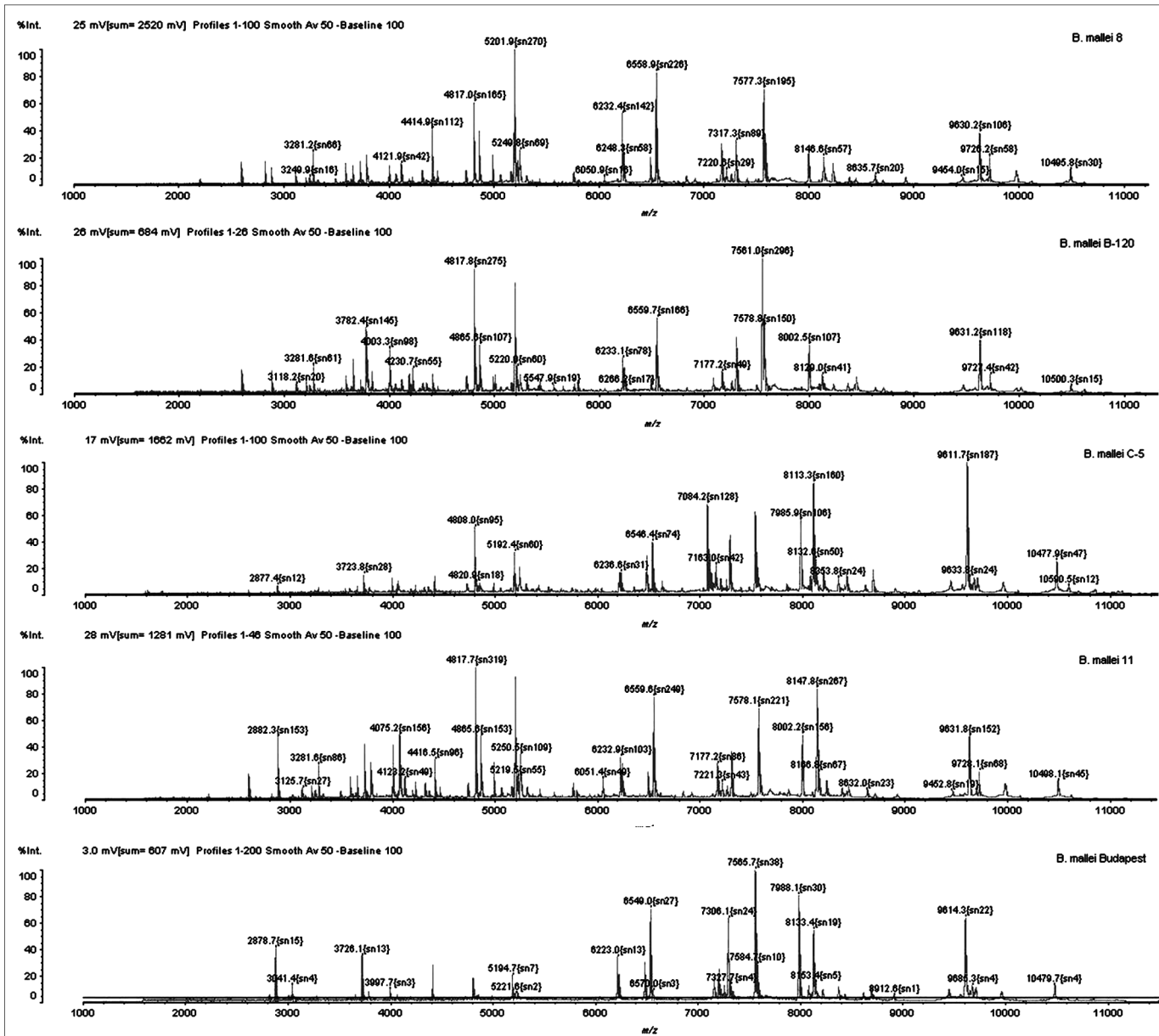


Рис. 1. Референсные масс-спектры общеклеточных белков штаммов патогенных буркхольдерий. а — *B. mallei*, б — *B. pseudomallei*.

Confidence (Shimadzu), не предусмотрена дезинфекция внутренней рабочей зоны, одними из задач настоящей работы являлись выбор и оценка инактивирующей способности метода пробоподготовки для анализа вирулентных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Белковые препараты штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, полученные методом спиртовой обработки с дальнейшей экстракцией муравьиной кислотой и ацетонрилом по описанному выше протоколу, подвергались проверке на специфическую стерильность. Высев экстрактов на плотные и жидкие питательные среды с инкубацией при температуре 37°C в течение 5 сут показал отсутствие жизнеспособных форм *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Следует отметить, что в базе данных S.A.R.A.M.I.S.TM референсные спектры микроорганизмов видов *B. pseudomallei* и *B. mallei* соответствуют масс-спектрам чистых препаратов рибосомальных протеинов, в то время как в данной работе

подготовленные пробы являлись препаратами полного набора клеточных белков. Поэтому нами предварительно были сформированы соответствующие подразделы базы данных масс-спектров исследуемых микроорганизмов, а также наборы спектров, используемых в качестве референтных при идентификации и хемотипировании штаммов.

В базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM были импортированы 10 референсных спектров белковых экстрактов типичных штаммов патогенных буркхольдерий, выращенных на L-агаре (рис. 1). При получении масс-спектров были использованы следующие параметры: алгоритм идентификации пика — Threshold-25% Centroid, отношение сигнал/шум для спектров — не менее 5, минимальная интенсивность пика — не менее 100 относительных единиц, количество качественных пиков — до 200, ширина пика — 4 m/z. Референсные масс-спектрометрические профили штаммов представлены на

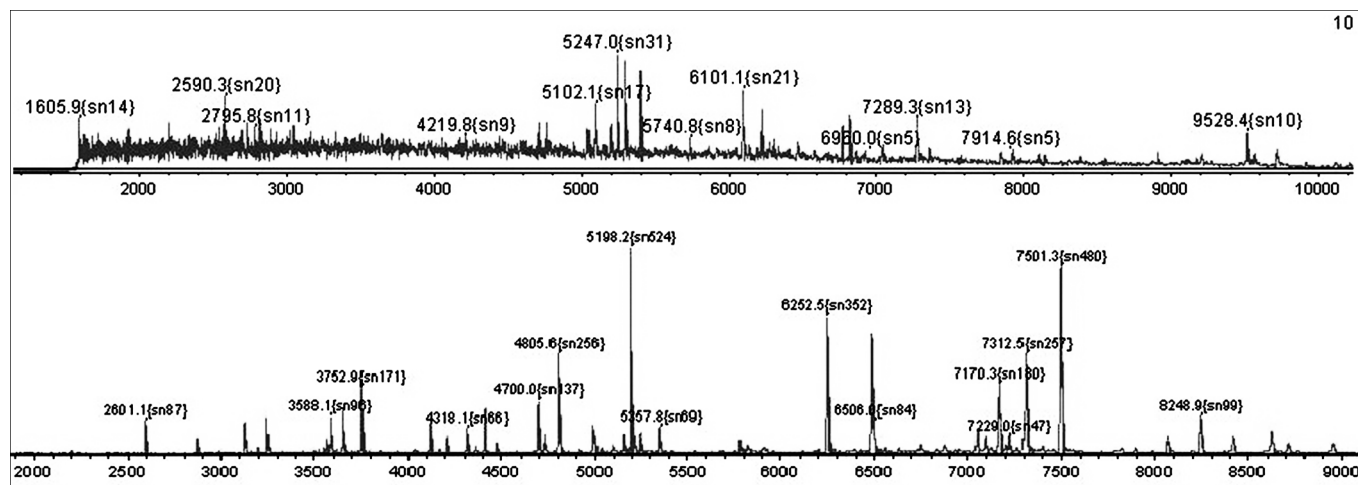


Рис. 2. Масс-спектры общеклеточных белков штамма *B. pseudomallei* 109, выращенного на АГК (верхний спектр) и на L-агаре (нижний спектр).

рис. 1. Дальнейшая идентификация остальных культур проводилась с использованием дополненной базы данных. Результаты масс-спектрометрической идентификации практически полностью совпадали с данными классического бактериологического анализа и генодиагностических тестов.

Известно, что условия культивирования (различные питательные среды, время и температура выращивания) могут влиять на результат масс-спектрометрического белкового анализа в идентификации [1, 8]. При масс-спектрометрическом профилировании штаммов, выращенных на L-агаре и на АГК, выявлена зависимость качества получаемых белковых профилей от питательной среды. Так, масс-спектры, полученные из культур, выращенных на АГК, характеризовались меньшим количеством и интенсивностью пиков, а также большим зашумлением (рис. 2). Не было выявлено значимых различий в характеристиках белковых масс-спектров 18- или 24-часовых агаровых культур. Также установлено, что при использовании клеток, культивируемых более суток, получение гомогенной суспензии было крайне затруднительным, что делало такую пробу непригодной для дальнейшего анализа. На основании полученных результатов для масс-спектрометрического профилирования штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* в качестве питательной среды применялся L-агар и период культивирования не более 24 ч. Вместе с тем, при использовании любой из этих сред удалось идентифицировать микроорганизмы до вида (табл. 2).

С целью оценки воспроизводимости белковых масс-спектров культуры патогенных буркхольдерий исследовали троекратно с интервалом 6 мес. В результате было выяснено, что масс-спектрометрические профили, полученные для одного штамма, остаются фактически идентичными в течение всего времени исследования.

Детальный анализ масс-спектров белков выявил наличие пиков с определенными молекулярными массами, характерными для культур *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Из 64 протеинов, отображенных на графических профилях, 7 (3780, 4815, 5202, 6560, 7090, 7560, 9624 и 10460 Da) были найдены в спектрах всех 43 исследованных образцов, пять из них — 4815, 5202, 6560, 7560, 9624 Da — имели максимальную интенсивность. Белок с конкретной молекулярной массой, наличие или отсутствие которого на масс-спектре позволило бы отнести исследуемый образец либо к *B. pseudomallei*, либо к *B. mallei*, мы не обнаружили. Однако на белковых профилях легко визуализировался ряд пептидов со значительными раз-

личиями по интенсивности выраженности пика в зависимости от видовой принадлежности. Так, пики масс-спектров с молекулярными массами 6560, 8000, 8127 Da отличаются у исследуемых видов и, возможно, могли бы рассматриваться как дифференцирующий признак

Кластерный анализ полученных масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий с использованием алгоритма neighbor-joining [10] продемонстрировал группирование исследованных штаммов в соответствии с их видовой принадлежностью, однако какие-либо закономерности их распределения в зависимости от биохимических свойств, особенностей антигенной структуры и вирулентности проследить не удалось (рис. 3).

Аналогичный методологический подход был использован А. Karger и соавт. [8] в работе по оценке эффективности идентификации патогенных буркхольдерий методом MALDI ToF MS с использованием платформы MALDI Biotyper (Bruker).

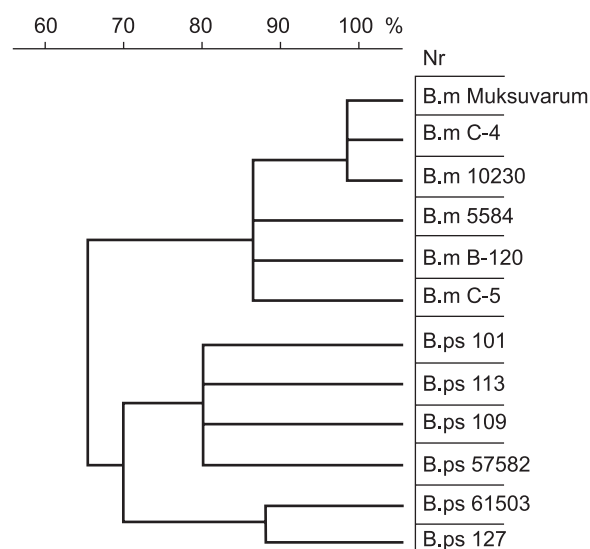


Рис. 3. Кластерный анализ полученных масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий.

Авторами показано, что дифференциация *B. pseudomallei* и *B. mallei* была затруднена в случае использования в качестве элемента сравнения в базе данных индивидуальных масс-спектров штаммов микроорганизмов, однако дискриминирующую способность метода удалось повысить при предварительном формировании MSP-спектров для каждого из видов, соответствующих референсным спектрам платформы S.A.R.A.M.I.S.TM.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан методологический подход к идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков. В ходе работы был оптимизирован протокол пробоподготовки культур возбудителей согласно требованиям биологической безопасности при манипуляциях с ПБА II группы патогенности, подобраны условия культивирования штаммов и сформирован набор референсных масс-спектров для идентификационной базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH). Анализ 43 коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий продемонстрировал возможность достоверного определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов до видового уровня. Пополненная база масс-спектральных характеристик в дальнейшем позволит проводить экспресс-идентификацию изолятов, подозрительных на принадлежность к возбудителям мелиоидоза и сапа, а также будет являться основой для разработки схем хемотипирования штаммов буркхольдерий методом масс-спектрометрии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 6—13 см. REFERENCES)

1. Афанасьев М.В., Остяк А.С., Балахонов С.В. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителя чумы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(8): 39—43.
2. Методические рекомендации МР 4.2.0089—14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I—II групп патогенности. М.; 2014.
3. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник РАН*. 2003; 73(3): 195—204.
4. Алексеев В.В., ред. *Опасные инфекционные заболевания: учебное пособие (I и II части)*. Волгоград; НП «Здоровье и экология»; 2006.
5. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Водяницкая С.Ю., Чемисова О.С., Чайка И.А. Применение масс-спектрометрического метода Maldi-ToF для межвидовой дифференциации близкородственных вибрионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(8): 27—8.

Поступила 03.03.16

REFERENCES

1. Afanas'ev M.V., Ostyak A.S., Balakhonov S.V. Approbation of a method of mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization for identification of the causative agent of plague. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(8): 39—43. (in Russian)
2. Methodical recommendations MR 4.2.0089—14. Using the method of time-of-flight mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-ToF MS) for the display and identification of causative agents I—II groups of pathogenicity. Moscow; 2014. (in Russian)
3. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynyuk R.A. Bioterrorism: national and global threat. *Vestnik RAN*. 2003; 73(3): 195—204. (in Russian)
4. Alekseev V.V., ed. *Dangerous Communicable Diseases: a Training Manual (I and II part) [Opasnye infektsionnye zabolevaniya: uchebnoe posobie (I i II chasti)]*. Volgograd; NP «Zdorov'e i ekologiya»; 2006. (in Russian)
5. Telesmanich N.R., Chayka S.O., Vodyanitskaya S.Yu., Chemisova O.S., Chayka I.A. Application of mass spectrometric method is Maldi-Tof for species differentiation of closely related Vibrio. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(8): 27—8. (in Russian)
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR*. 2000; 49(RR-4): 1—26.
7. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 (Suppl.1): S1—4.
8. Karger A., Stock R., Ziller M., Elschner M.C., Bettin B., Melzer F. et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 229.
9. Lasch P., Natterman H., Stämmler M., Appel B., Naumann D. Inactivation of Microbial Cells and Spores for MALDI-TOF Mass Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2008; 80(6): 2026—34.
10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406—25.
11. Vanlaere E., Sergeant K., Dawyndt P., Kallow W., Erhard M., Sutton H. et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J. Microbiol. Methods*. 2008; 75(2): 279—86.
12. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2013; 8: 131.
13. Zhou N., Wang N., Xu B., Wang J., Fang J., Dong F. et al. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media. *Sci. China Life Sci.* 2011; 54(1): 48—53.

Received 03.03.16