

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА ЭЛЬТОР

¹Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону; ²Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучение механизмов взаимодействия диагностического бактериофага эльтор с чувствительным к нему штаммом *Vibrio cholerae* El Tor 18507 с помощью прямого белкового профилирования, идентификация константных и переменных белков, участвующих во взаимодействии фага и клетки, а также углеводов-специфических рецепторов фага. *Материалы и методы.* Использовали коммерческий препарат холерного диагностического бактериофага эльтор, штамм *V.cholerae* El Tor 18507. Влияние углеводов на активность бактериофага определяли путем постановки пробы с фагом классическим и модифицированным нами методом. Белковые профили исследуемых объектов изучали с помощью метода MSP-анализа. *Результаты.* Показано, что сахароза ингибирует литическую активность бактериофага. Были изучены протеомные профили бактериофага эльтор и чувствительного индикаторного штамма, проведена идентификация константных и переменных белков исследуемых объектов посредством программы MSP Peak-List. *Заключение.* Анализ изменения профилей фага и микробной клетки при взаимодействии с сахарозой дал основание предположить, что сахароза в смеси культура — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфические к холерному вибриону рецепторы, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 85—90

Ключевые слова: MALDI масс-спектрометрическое профилирование, протеомный профиль, Виотyper, MSP Peak-List, *Vibrio cholerae* El Tor, бактериофаг диагностический холерный эльтор

N.R.Telesmanich¹, E.V.Goncharenko², S.O.Chaika², I.A.Chaika², V.O.Telicheva²

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY FOR STUDY OF CARBOHYDRATE-SPECIFIC RECEPTORS FOR DIAGNOSTIC BACTERIOPHAGE EL TOR

¹Rostov State Medical University, Rostov-on-Don; ²Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Aim. Study mechanisms of interaction of diagnostic bacteriophage El Tor with sensitive strain *Vibrio cholerae* El Tor 18507 using direct protein profiling, identification of constant and variable proteins, taking part in interaction of the phage and cell, as well as carbohydrate-specific phage receptors. *Materials and methods.* A commercial preparation of cholera diagnostic bacteriophage El Tor, strain *V.cholerae* El Tor 18507 were used. Effect of carbohydrates on bacteriophage activity was determined in experiments with phage by a classic and modified by us method. Protein profiles of the studied objects were studied using MSP-analysis method. *Results.* Sucrose was shown to inhibit lytic activity of bacteriophage. Proteome profiles of El Tor bacteriophage and sensitive indicator strains were studied, identification of constant and variable proteins of the studied objects by MSP Peak-list program was carried out. *Conclusion.* Analysis of changes of profiles of phage and microbial cell during interaction with sucrose gave a basis for assuming, that sucrose in the mixture of culture-phage enters interaction namely with phage protein receptors, blocking receptors specific for cholera vibrio, that subsequently manifests in a sharp decrease of phage activity against the sensitive strain.

Key words: MALDI mass-spectrometric profiling, proteomic profile, Biotyper, MSP Peak-List, *Vibrio cholerae* El Tor, diagnostic cholera bacteriophage El Tor

Немаловажную роль в изменчивости и выживаемости холерных вибрионов в водоемах играют фаги [2]. Бактериофаги являются постоянным спутником патогенных вибрионов, а их присутствие в клетках бактерий приводит к появлению новых свойств и обеспечивает эволюционную приспособляемость микроорганизмов к меняющимся условиям окружающей среды за счет переноса генетического материала [4]. Обнаружение холерных бактериофагов является мерой дополнительного контроля природной среды. Трудности широкого применения бактериофагов, в основном, связаны с проблемой формирования фагорезистентности микроорганизмов, что отрицательно сказывается на диагностической ценности фаговых препаратов. С научной точки зрения проблема расшифровки механизмов фагорезистентности, с которой сталкиваются исследователи в последние двадцать лет, при оценке эпидемической значимости не утратила своей актуальности [6]. Фагоустойчивость бактерий связывают с классической лизогенией, нарушением проникновения нуклеиновой кислоты фага в бактерию, наличием у бактерий системы рестрикции-модификации, приобретением R-плазмид и др. [1]. Возможным подходом к изучению формирования фагорезистентности является изучение поверхностных структур, таких как углевод-специфические рецепторы фагов, участвующих во взаимодействии с поверхностными структурами клеток-мишеней холерного вибриона, методом масс-спектрометрии [5, 8]. Возможности прямого белкового профилирования могут распространяться значительно шире, чем идентификация микроорганизмов бактериального и грибкового происхождения. Измерение стабильного спектра белкового объекта и его деградация может способствовать изучению бактерий (фагов) и их взаимоотношений с бактериальной клеткой.

Детальное изучение молекулярных основ механизмов взаимоотношения бактериофага с клеткой хозяина имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Важным аспектом является знание поверхностных компонентов изучаемых объектов, ответственных за этот процесс [7]. Особую роль в межклеточных взаимодействиях играют лектиновые рецепторы, поэтому изучение углеводной специфичности рецепторов фагов является важным для познания механизмов формирования фагорезистентности.

Целью данной работы явилось изучение механизмов взаимодействия диагностического бактериофага эльтор с чувствительным к нему штаммом *Vibrio cholerae* El Tor 18507 с помощью прямого белкового масс-спектрометрического профилирования, идентификация константных и переменных белков, участвующих во взаимодействии фага и клетки, а также углевод-специфических рецепторов фага.

В работе использовали коммерческий препарат холерного диагностического бактериофага эльтор и чувствительный к нему паспортизированный музейный штамм *V.cholerae* El Tor 18507. Препарат фага эльтор представляет собой стерильные фильтраты фаголизатов бульонных культур холерных вибрионов, содержащих взвесь частиц фага эльтор.

Для изучения роли углевод-специфических рецепторов, участвующих во взаимодействии микробных клеток холерного вибриона с исследуемым фагом, в работу был взят углевод — сахароза фирмы «Serva» в конечной концентрации 1%.

Питательные среды для экспериментов включали бульон и агар Мартена (0,7 и 1,5%) рН=7,6 — 7,8.

В работе применяли следующие методики. Постановку пробы с фагом двухслойным методом по Грациа проводили в соответствии с инструкцией по применению диагностического бактериофага эльтор. Модифицированная постановка пробы с фагом двухслойным методом. Постановка пробы проводится аналогично методу Грациа,

за исключением того, что каждое рабочее разведение фага предварительно инкубировали с углеводом в конечной концентрации 1% в течение 1 часа. Классический метод использовали в качестве контроля активности фага, а модифицированный — для изучения влияния углевода на активность бактериофага эльтор.

Изучение белковых профилей исследуемых объектов проводили с помощью метода MSP-анализа. Методом прямого MALDI масс-спектрометрического профилирования были исследованы бактериофаг эльтор, чувствительная к нему культура холерного вибриона, смесь фага с культурой холерного вибриона. Также было исследовано изменение белкового профиля фага при инкубации с сахарозой для выявления белков, участвующих в гликозилировании лектиновых рецепторов, а также изменения этих белков в результате взаимодействия с углеводом.

Все образцы проводили через процедуру экстракции трифторуксусной кислотой (80% TFA) для создания репрезентативных спектров, а также для культур холерных вибрионов — с целью обеззараживания. Каждый образец оставляли на 30 мин. при комнатной температуре, добавляли 150 мкл бидистиллированной воды и 20 мкл ацетонитрила. Смесь встряхивали на вортексе, центрифугировали (12 000 — 13 000 об/мин) — 2 минуты. Супернатант в количестве 0,5 мкл размещали на ячейке MSP-чипа, и после полного высыхания наслаивали 0,5 мкл раствора матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота в 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). В программе Flex Control проводили обстрел в ручном режиме, снимали спектры и проводили их анализ. По шкале абсцисс были отложены значения m/z (молекулярная масса), по шкале ординат — интенсивность пиков, регистрируемая при масс-спектрометрическом анализе (количество белков с конкретной молекулярной массой). Изменения основных спектров фага эльтор и микробной клетки холерного вибриона при их взаимодействии и под влиянием углевода (сахарозы) оценивали по степени достоверных совпадений в виде показателя score, который отражает степень схожести профиля изучаемого объекта с белковым профилем объекта, внесенного в базу данных, измеряется в диапазоне от 0 до 3. Значения 2,00 — 3,00 указывают на высокое совпадение изучаемого объекта с объектом базы данных, значения 1,700 — 1,999 — низкая схожесть с объектом из базы данных, менее 1,700 — отсутствие совпадений. Используя программу MSP Peak-List проводили табличную оценку основных спектров изучаемых объектов.

Изначально мы изучили основные спектры исследуемых объектов, которые оценивались по таким параметрам, как положение пиков (молекулярная масса), их частота, интенсивность (количество белков с конкретной молекулярной массой) [3, 5, 8]. Было выяснено, что масс-спектры фага El Tor содержали 70 пиков, культуре *V.cholerae* 18507 был присвоен 61 пик. У проинкубированной смеси фага с холерным вибрионом сохранялось 70 пиков. MALDI масс-спектрометрическое профилирование бактериофага эльтор показало, что у данного фага можно выделить из всех 70 пиков один доминантный с молекулярной массой 4373 Да, характеризующийся 100% интенсивностью и свидетельствующий о максимальном количестве белков с данной молекулярной массой, в то время, как интенсивность остальных пиков фага составила 1 — 20%. Это свидетельствует о том, что комплекс белков с молекулярной массой 4373 Да является основным для фага. При сравнительном анализе протеомных профилей исследуемых образцов было выяснено, что основной спектр холерного вибриона при инкубации с фагом имел практически аналогичную картину с исходным образцом *V.cholerae*. Молекулярная масса доминантного пика белкового спектра смеси составила 4367,2 Да (100% интенсивность). Все основные пики спектра *V.cholerae* сохранились, но при взаимодействии с фагом снизилась их интенсивность, и появились новые пики с невысокой интенсивностью.

Также нами была изучена роль лектиновых рецепторов бактериофага в его взаимодействии с микробной клеткой. Для этого применяли метод конкурентного ингибирования путем введения в систему фаг — клетка свободного углевода (сахарозы). Бактериологическими методами было показано, что сахароза ингибирует литическую

активность бактериофага. При постановке пробы с фагом двухслойным методом на чашках фаг, проинкубированный с сахарозой, не давал сплошной зоны лизиса в месте нанесения по сравнению с контролем, что свидетельствовало об активности рецепторов фага, специфичных сахарозе во взаимоотношении фаг — микробная клетка.

При проведении сравнительного анализа белкового спектра нативного фага эльтор и образца, проинкубированного с сахарозой, было выяснено, что при взаимодействии с сахарозой происходит ингибирование доминантных белков фага с массой 4373 Да. В процессе каскада реакций образуется большое количество новых белков с низкой интенсивностью в диапазоне 7000 — 14 500 Да, и возрастает интенсивность уже имеющихся белков в диапазоне от 3 до 4,5 тысяч Да.

При инкубации исследуемого штамма *V.cholerae* 18507 с 1% сахарозой (1 час) не наблюдалось значимого изменения картины основного спектра. Таким образом, можно предположить, что сахароза в смеси культура — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфичные к холерному вибриону углевод-специфичные рецепторы с молекулярной массой 4373, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму. Это было показано нами ранее в микробиологических опытах.

Основным преимуществом программы MALDI Biotyper («Bruker Daltonics») является возможность пополнения персональной базы новыми спектрами и подключение к MALDI Biotyper-программе для обработки и анализа масс-спектров для последующей идентификации, которая в дальнейшем будет основана на сравнении полученных спектров с персональной библиотекой референтных спектров. Фаг эльтор был нами внесен в базу данных, в дальнейшем при профилировании фаг идентифицировался программой Biotyper с высоким показателем score 2,845, что свидетельствовало о степени «узнавания» самого себя в базе данных. При сравнении спектра холерного вибриона с внесенным в базу данных спектром фага показатель score равнялся нулю, что явилось отрицательным контролем в корректности «узнавания» фагом самого себя. При сравнении спектров смеси (фаг + холерный вибрион) со спектром фага из базы данных значение score соответствовало 0,324, что свидетельствовало об изменении спектра фага. Но когда в знаменателе был спектр не фага, а холерного вибриона, внесенного в базу данных, показатель score смеси фага с холерным вибрионом резко повышался и равнялся 2,449, что свидетельствовало об отсутствии изменений со стороны культуры в смеси фаг — клетка. Профили фага эльтор и культуры холерного вибриона, проинкубированные с сахарозой, также были изучены в сравнении с профилем фага, внесенного в базу данных. При инкубации с сахарозой, фаг не «узнавал» себя в базе данных (score 0,973), в отличие от холерного вибриона, который при взаимодействии с сахарозой продолжал «узнавать» себя с высоким показателем score, равным 2,380. При сравнительном изучении показателей score видно, что при инкубации с сахарозой изменения происходят именно у фага, а не у холерного вибриона.

При применении программы Biotyper возможна табличная оценка молекулярных масс (MSP Peak-List). Основные спектры каждого изучаемого объекта посредством данной программы преобразовывались в таблицы MSP Peak-List. В дальнейшем нами были проанализированы данные MSP Peak-List бактериофага, холерного вибриона и проинкубированной смеси. И в MSP Peak-List мы выявили аналитическим путем принадлежность каждого пика либо спектру культуры, либо спектру фага, а также новые спектры, возникающие при взаимодействии фага с культурой и при добавлении сахарозы.

Анализируя пики при помощи MSP Peak-List было выяснено, что у фага эльтор 6 пиков, которые при инкубировании с культурой холерного вибриона не исчезают (3116,6; 3213,5; 33316; 3834,9; 3983,2 и 6194,8±1,5). Однако при добавлении сахарозы последний пик белкового спектра исчезает. Таким образом, у фага эльтор выявлено 5 константных белков и один переменный.

Аналогичным образом мы сравнили протеомный профиль *V.cholerae* 18507 до и

после инкубирования с фагом. Нами выявлено, что после инкубации сохраняется 33 пика из 61, которые при добавлении сахарозы также остаются константными, помимо одного переменного.

Помимо константных и переменных белков, были выявлены пики, появляющиеся при совместном инкубировании фага с микроорганизмом, которых не было ни у фага, ни у культуры до инкубирования. Таковых оказалось 31 пик. Однако в присутствии сахарозы эти пики (белки) вели себя по-разному: 8 пиков исчезает из таблицы, однако 23 пика остаются неизменными, и при этом появляется 10 комплексов белков с совершенно новыми значениями масс.

Изучение механизмов фагорезистентности имеет важное научно-прикладное значение. Вместе с тем, продолжает оставаться актуальным изучение взаимоотношений фага и микробной клетки с помощью новейших методов исследования, результаты которых затем могут быть использованы в выяснении формирования фагорезистентности, где важная роль принадлежит изменению поверхностных структур фаговой корпускулы и клетки микроорганизма. Бактериофаги имеют на своей поверхности целый спектр рецепторов, узнающих углеводы и определяющих специфичность межклеточных взаимодействий. Спектр этих рецепторов различается у разных видов бактерий и фагов и является определяющим в рецептор-акцепторных взаимодействиях в системе фаг — бактерия. В свою очередь, на поверхности бактериальных клеток в качестве лигандов рецепторов выступают углеводы, являющиеся своеобразными антеннами, передающими сигнал внутрь клетки после взаимодействия с рецептором. Такие взаимодействия являются ключевыми для бактериальной клетки и стимулируют каскад биологических реакций. Подобная система может действовать на модели фаг — клетка при изучении углеводной специфичности рецепторов фага. В литературе имеется очень мало информации об изучении углевод-специфических рецепторов фагов. Одним из новых методов, используемых для изучения механизмов фагорезистентности, является MALDI-TOF масс-спектрометрия. MALDI масс-спектрометрия — методический подход, использующий протеомный анализ в изучении биологических объектов, в основном, используется для идентификации микроорганизмов, однако изучение его возможностей для применения в научных исследованиях является основной задачей, которая будет способствовать развитию приоритетных направлений протеомного анализа. Наши исследования посвящены изучению фагов с помощью данного метода. В литературе не было найдено аналогичных работ по изучению бактериофагов посредством MALDI-TOF масс-спектрометрии. В результате проведенных исследований впервые были изучены протеомные профили бактериофага и чувствительной к нему культуры холерного вибриона. Проведен протеомный анализ изменения профиля фага при взаимодействии с углеводами на поверхности микробной клетки с применением метода конкурентного ингибирования при использовании свободного углевода. Была проведена сравнительная характеристика изменения белковых профилей при взаимодействии фаг — клетка. Установлено, что комплекс доминантных белков, соответствующих молекулярной массе 4373 Да, является рецепторами фага, участвующими во взаимодействии с микробной клеткой холерного вибриона. Показано, что сахароза в смеси холерный вибрион — фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага (комплекс белков с массой 4373 Да), блокируя этим лектиновые рецепторы фага, специфичные поверхностным структурам холерного вибриона. Это проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму. Эти исследования были подтверждены нами при изучении показателей score данных объектов. Протеомный профиль бактериофага эльтор был внесен нами в базу данных, и проведен сравнительный анализ спектров исследуемых образцов со спектром фага из базы данных с использованием показателя score. Сравнительный анализ показателей score изменения белковых профилей фага при инкубации с сахарозой и штамма холерного вибриона при инкубации с этим углеводом продемонстрировал существенные изменения протеома именно со стороны фага (score 0,973). Протеомный профиль

холерного вибриона оставался практически неизменным, и культура идентифицировалась базой данных с достаточно высоким показателем score, равным 2,380. Следовательно, именно бактериофаг претерпевает основные изменения протеомного профиля в процессе взаимодействия. И именно его лектиновые рецепторы, специфичные сахарозе, играют ключевую роль в ослаблении литической активности по отношению к чувствительной культуре. При сравнении спектров смеси фаг + холерный вибрион со спектром фага из базы данных значение score соответствовало 0,324, что свидетельствовало об изменении спектра фага. Но когда в знаменателе был спектр не фага, а холерного вибриона, внесенного в базу данных, показатель score смеси фага с холерным вибрионом резко повышался и равнялся 2,449. Что свидетельствовало об отсутствии изменений со стороны культуры в смеси фаг-клетка.

Используя табличную оценку молекулярных масс удалось проанализировать данные MSP Peak-List бактериофага, холерного вибриона и проинкубированной смеси. И в MSP Peak-List мы выявили аналитическим путем константные и переменные белки, возникающие после совместного инкубирования, участвующие в рецепторных взаимодействиях фага с холерным вибрионом. Так, было выяснено, что у фага эльтор 5 константных белков и один переменный.

Аналогичным образом мы сравнили протеомный профиль *V.cholerae* 18507 до и после инкубирования с фагом. Нами выявлено, что у холерного вибриона 32 константных белка и один переменный.

Помимо константных и переменных белков, были выявлены пики, появляющиеся при совместном инкубировании фага с микроорганизмом, которых не было ни у фага, ни у культуры до инкубирования (31 пик). Однако в присутствии сахарозы эти пики (белки) вели себя по-разному: 8 пиков исчезает из таблицы, однако 23 пика остаются неизменными, и при этом появляется 10 комплексов белков с совершенно новыми значениями масс.

Таким образом, применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии является эффективным инструментом не только для идентификации микроорганизмов, но и для изучения фагов и механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерябин Д.Г. Антилизозимная активность бактерий как фактор их фагорезистентности. Автореф. дисс. канд. мед. наук. Челябинск, 1989.
2. Кудрякова Т.А., Гаевская Н.Е., Качкина Г.В. Биологические свойства фагов патогенных вибрионов, выделенных из внешней среды. *Здравоохранение РФ*. 2011, 5: 41.
3. Лебедева А.Т., Артеменко К.А., Самгина Т.Ю. Основы масс-спектрометрии белков и пептидов. М., Техносфера, 2012.
4. Остроумова Н.М., Мельникова А.Ф., Царева С.П. Проблемы ООИ. 1971, 6: 4-10.
5. Телесманич Н.Р., Агафонова В.В., Чайка И.А., Сеина С.О., Чемисова О.С., Гончаренко Е.В. MALDI масс-спектрометрический анализ в типировании и внутривидовой дифференциации холерных вибрионов на основе создания референс-библиотеки протеомных профилей. *Медицинский вестник Юга России*. 2014, 2: 88-91.
6. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Лабораторная диагностика холеры (анализ и перспективы совершенствования). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009, 11: 51-55.
7. Телесманич Н.Р., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Гончаренко Е.В. Роль галактозо-специфического рецептора — лектина в бактерицидной активности гемолизина *Vibrio cholerae* не O1/O139. *Журн. микробиол.* 2010, 1: 10-14.
8. 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 видов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014, 8 (59): 27-28.

Поступила 10.06.15

Контактная информация: Чайка Софья Олеговна,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

С.Н.Гаврилов, Т.С.Скачкова, О.Ю.Шипулина, Ю.А.Савочкина, Г.А.Шипулин, В.В.Малеев

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СЕПСИСА

Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Этиологическая диагностика сепсиса представляет собой одну из наиболее сложных проблем современной медицины в связи с широким разнообразием возбудителей сепсиса, многие из которых являются компонентами нормальной микрофлоры человека. Недостатками современного «золотого стандарта» микробиологической диагностики этиологии сепсиса методом посева крови на стерильность являются длительность культивирования, ограничение в выявлении некультивируемых форм микроорганизмов, значительное влияние предварительной эмпирической антибиотикотерапии на результат анализа. Этих недостатков лишены методы молекулярной диагностики, активно разрабатываемые и внедряемые в последнее десятилетие. В обзоре рассмотрены основные современные методы молекулярно-биологической диагностики, приведены актуальные данные по их диагностической характеристике. Особое внимание уделено методам ПЦР-диагностики, включая новые российские разработки. В сравнительном аспекте рассмотрены методы гибридизации нуклеиновых кислот и протеомного анализа. Дана оценка применения и перспектив развития методов молекулярной диагностики сепсиса.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 91—99

Ключевые слова: сепсис, молекулярные методы, этиология сепсиса, методы молекулярной диагностики, ПЦР, ПЦР в реальном времени

S.N.Gavrilov, T.S.Skachkova, O.Yu.Shipulina, Yu.A.Savochkina, G.A.Shipulin, V.V.Maleev

CONTEMPORARY MOLECULAR-GENETIC METHODS USED FOR ETIOLOGIC DIAGNOSTICS OF SEPSIS

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Etiologic diagnostics of sepsis is one of the most difficult problems of contemporary medicine due to a wide variety of sepsis causative agents, many of which are components of normal human microflora. Disadvantages of contemporary «golden standard» of microbiologic diagnostics of sepsis etiology by seeding of blood for sterility are duration of cultivation, limitation in detection of non-cultivable forms of microorganisms, significant effect of preliminary empiric antibiotics therapy on results of the analysis. Methods of molecular diagnostics that are being actively developed and integrated during the last decade are deprived of these disadvantages. Main contemporary methods of molecular-biological diagnostics are examined in the review, actual data on their diagnostic characteristic are provided. Special attention is given to methods of PCR-diagnostics, including novel Russian developments. Methods of nucleic acid hybridization and proteomic analysis are examined in comparative aspect. Evaluation of application and perspectives of development of methods of molecular diagnostics of sepsis is given.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 91—99

Key words: sepsis, molecular methods, sepsis etiology, molecular diagnostics methods, PCR, real time PCR