

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИОФАГОВ *PROTEUS PHAGE* (PR 4 – УГСХА), *ENTEROBACTER PHAGE* (E7) И *YERSINIA PHAGE* (YE3-F2)

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: бактериофаг, *Proteus phage*, *Enterobacter phage*, *Yersinia phage*, ПЦР, детекция, система, праймеры, филогенетическое дерево

В статье представлены результаты исследований по разработке системы ПЦР-детекции бактериофагов *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-f2). Построено филогенетическое дерево соответствия их генетической организации между собой и установлено, что соответствие между геномами *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-f2) составляет от 24 до 31%. Определено, что специфичный фрагмент для *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА) расположен в области генома 3700-4500 п.н. Высокоспецифичных фрагментов, характерных только *Enterobacter phage* E7 и *Yersinia phage* Ye3-f2 в исследуемых геномах не было выявлено, однако были обнаружены области, при совместном использовании ПЦР для которых, позволит детектировать только геном данной группы. Установлены две области, одновременное выявление которых характерно для *Enterobacter phage* и для *Yersinia phage*. В системе BLAST были определены системы праймеров для одновременного выявления фрагментов генома, характерных для группы изучаемых бактериофагов. В результате проведенных исследований были разработаны системы праймеров для ПЦР типирования бактериофагов *Protes*, *Enterobacter* и *Yersinia* групп, позволяющие проводить индикацию бактериофагов, относящихся к определенным группам в материале, полученном из объектов окружающей среды и патологического материала без выделения чистой культуры при скринингах указанных групп при детекции фрагмента генома размером 125 п.н. в области 3700-4500 п.н. ДНК *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА); размерами 294 и 431 п.н. в областях 17500-18000 и 26500-27500 п.н. соответственно ДНК *Enterobacter phage* (E7) и размерами 226 и 85 п.н. в областях 2000-2500 и 24100-24300 п.н. соответственно *Yersinia phage* (Ye3-f2).

Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038.

Введение

Вирусы бактерий, количество которых много превышает общее количество бактерий, могут стать отличным специфичным инструментом в борьбе против бактериальных инфекций, так как при этом ни один из них не вреден для здорового

человека. Большое количество этих вирусов находится в природе - в почве, в воде, в кишечнике и тех же местах, где есть бактерии [1]. Известно, что при воздействии на лизогенные бактериальные культуры индуцирующим фактором (например, митомицином С и УФО) продукция фага в значи-

тельной степени возрастает, поэтому, применяя данную методику, удается выявить бактериофаг в значительно большем проценте случаев, чем при изучении только спонтанной его продукции [2-4].

В специальной литературе описывается ряд методов выделения бактериофагов из объектов окружающей среды и т.п.: прямой метод выделения из исследуемого материала, выделение методом обогащения «без подсева» и «с подсевом», обнаружение на плотных питательных средах методом Отто и двуслойным методом по Грация [5-7]. Это длительные и материалоемкие исследования, требующие высокой квалификации, завершение которых не гарантирует получение положительного результата [8]. Поэтому разработка метода, позволяющего на начальном этапе получить исследователю достоверную информацию о наличии или об отсутствии в анализируемом объекте искомого бактериофага – это актуальная задача, позволяющая расширить коллекцию фагов за счет сокращения времени работы с одной пробой при выделении и возможности анализа нескольких проб одновременно при экономии материалов и сокращении трудозатрат.

Цель работы – разработать систему ПЦР-детекции бактериофагов *Proteus phage* (PR 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-F2).

Объекты и методы исследований

Объекты исследований – вирулентный бактериофаг Ye3-f2, характеризующийся следующими свойствами: бляшкообразующие единицы – прозрачные, без зоны неполного лизиса, $1,0 \pm 1,5$ см; литическая активность – титр по Грация – $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, титр по Аппельману – 10^6 ; специфичен для культур, идентифицированных как *Yersinia enterocolitica*; культивирование при температуре 58°C в 30 минут приводит к инактивации [9].

В исследованиях использовали бактериофаг E7, имеющий следующие характеристики: бляшкообразующие единицы – прозрачные округлой формы, $3,5 \pm 0,5$ мм; литическая активность – титр по Грация – $2,0 \pm 0,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, титр по Аппельману – 10^9 ; специфичен для культур, идентифицированных как *Enterobacter spp.*; культивирование при температуре 65°C в 30 минут приводит к инактивации [10].

Бактериофаг Pr – 6 УГСХА выделен в 2017 году из объектов внешней среды – диаметр бляшкообразующих единиц – $0,5 \pm 0,1$ мм, титр по Грация – $1,3 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл, титр по Аппельману – 10^8 , устойчив у воздействию трихлорметана в течение 15 минут и специфичен для культур *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris* [11].

Материалы: 5-кратный раствор с ксиленцианолом, $7,5$ мМ MgCl₂ (ООО «Интерлабсервис» Кат. № 861), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфа-

тов (дНТФ). Водный раствор дезокси-нуклеозидтрифосфатов с концентрацией $1,76$ мМ каждого. (ООО «Интерлабсервис», Кат. № R3-1), смесь типоспецифических праймеров по 10 пкМ каждого (НПФ «Литех», Москва); Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл) (Promega, USA., Кат. № M5001), агароза («Хеликон» LOT 2308B504) или аналогичная, Трис-HCl, («Amresco» Кат. № Am-O234-0.5) или аналогичный, тритон X-100, («Amresco» Кат. № Am-O694-1.0) или аналогичный, борная кислота Хеликон (Кат. № H-0202-0.5, (о.с.ч.), ЭДТА-Na, («Amresco» Кат. № Am-O105-0.1) или аналогичный, NaCl («Хеликон» H-1401-1.0 (х.ч.), $0,1$ %-ный бромид этидия («Amresco», Кат. № Am-O492-1,0), маркер молекулярного веса, (ООО «Интерлабсервис», Кат. № MDNA-100bp), набор для очистки ДНК от агарозного геля «QIAquick Gel Extraction», QIAGEN, Германия), набор для секвенирования, набор для выделения ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-В», («ИнтерлабСервис», Москва), микроцентрифуга на 12000 об./мин. для пробирок объемом $1,5$ мл и $0,5$ мл (Eppendorf Minispin, Германия), автоматические пипеточные дозаторы на 20 мкл, 100 мкл и 1000 мкл (ThermoScientific), полипропиленовые пробирки на $0,2$ мл, $0,5$ мл и $1,5$ мл (Axygen, США), сменные наконечники к автоматическим пипеточным дозаторам (Axygen, США), амплификатор для проведения ПЦР («MaxyGene», AXYGEN Scientific, США), смеситель «Vortex» (Biosan, Латвия), твердотельный термостат (Термит, ДНК Технология, Москва), фильтрующие насадки Миллекс $0,22$ мкм (PVDF) (Millipore, Ирландия), генетический анализатор («Applied Biosystems 3130XL», Applied Biosystems, США), набор компонентов для очистки сиквенсовой смеси («BigDye Terminator kit 3.1», Applied Biosystem, США). Праймеры (F1__C2, F2__C2, F3__C2, F3__C2, R1__C2, R2__C2, R3__C2, F1__B, R1__B, F1__PODO, R1__PODO, terS-F, terS-R, mcp-F, mcp-R, mtp-F, mtp-R, tmp-F, tmp-R) были синтезированы в ООО «ЛИТЕХ». Реактивы производства «Fermentas» и «Альфа фермент».

Для постановки ПЦР «в режиме реального времени» кроме праймеров требуется флуоресцентный олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку. В системе Blast был осуществлен подбор наиболее оптимальных зондов для каждого из бактериофагов и определены их основные характеристики. Далее были проведены эксперименты с использованием ПЦР и специального оборудования – амплификатора с детекцией Real-Time (в данном проекте ДТ-прайм-5 (ДТ-96), ДНК-Технология, РФ). ДНК денатурировали при 95°C в течение 1 мин. Затем проводили 35 циклов, включающих денатурацию ДНК при 95°C в течение 10 сек, отжиг праймеров при температуре 60°C в течение 20 сек. Детекция осуществлялась на каждом

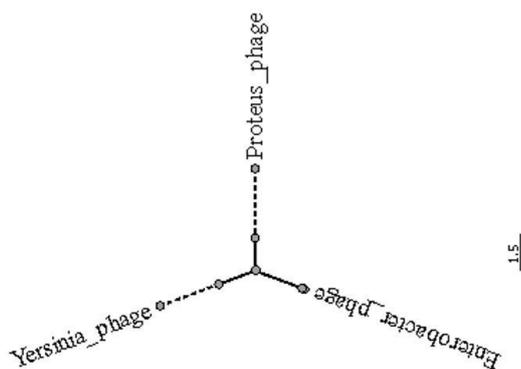


Рис. 1 - Филогенетическое дерево соответствия генетической организации *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-f2)

Таблица 1
Соответствие геномов *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-f2)

	Yersinia_phage	Proteus_phage	Enterobacter_phage
Yersinia_phage	39210	12274	10032
Proteus_phage	12274	44580	10596
Enterobacter_phage	10032	10596	36030

Таблица 2
Относительное соответствие геномов *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-f2)

	Yersinia_phage	Proteus_phage	Enterobacter_phage
Yersinia_phage	100%	31%	26%
Proteus_phage	28%	100%	24%
Enterobacter_phage	28%	29%	100%

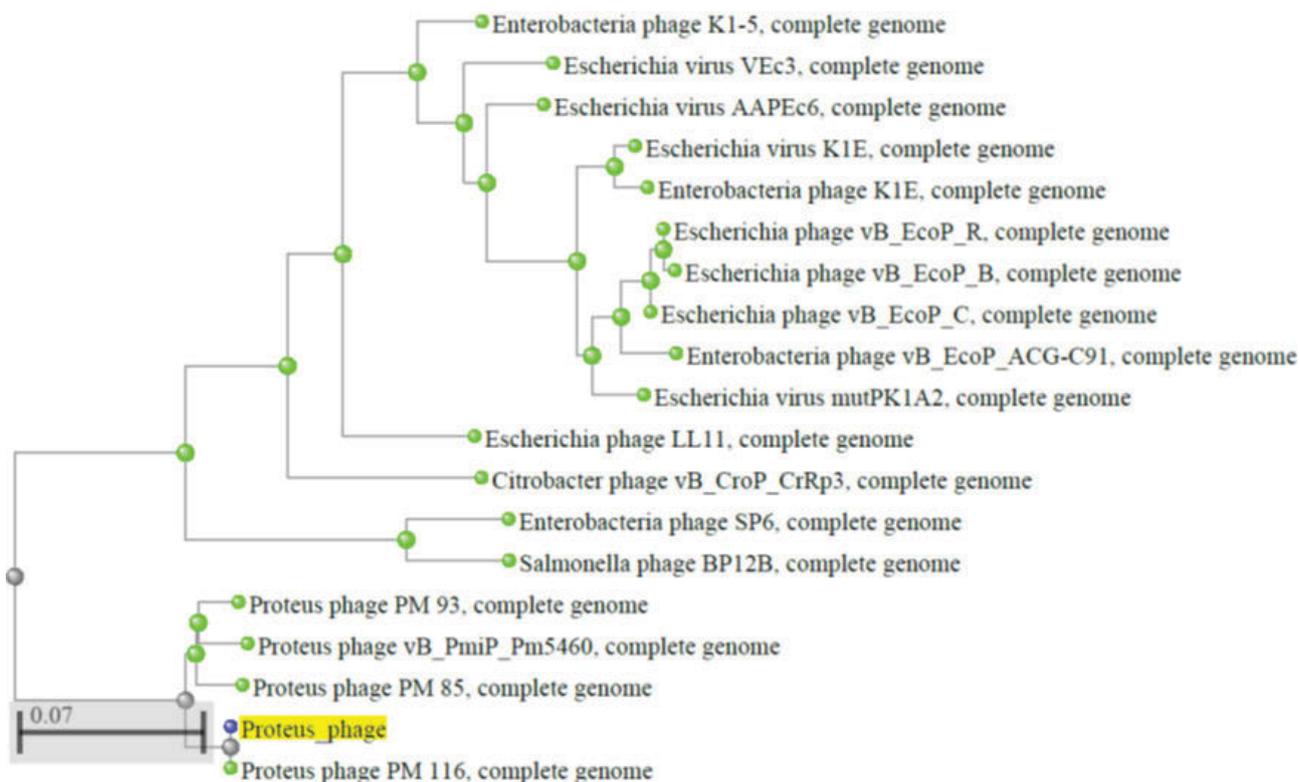


Рис. 2 - Филогенетическое дерево соответствия ДНК *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА) возможным аналогиям

из циклов при температуре 60 °C по каналу Fam.

Сравнение собранных геномов бактериофагов с геномами известных аннотированных бактериофагов проводили при помощи алгоритма blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и баз данных нуклеотидных последовательностей NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США). Визуализацию выравнивания собранных нами геномов с известными мы проводили с использованием программного обеспечения BLAST RingImageGenerator (BRIG).

Результаты исследований

Для целей возможной типизации выделен-

ных бактериофагов по группам нами было построено филогенетическое дерево соответствия их генетической организации между собой (рис. 1, табл. 1-2).

Поскольку соответствие между геномами *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7) и *Yersinia phage* (Ye3-f2) составляет от 24 до 31%, организация их в общую группу не представляется целесообразной. Исходя из этого, нами были разработаны системы для ПЦР-типирования групп бактериофагов в соответствии с их филогенетическим родством.

На основании сиквенсовых данных [8] были

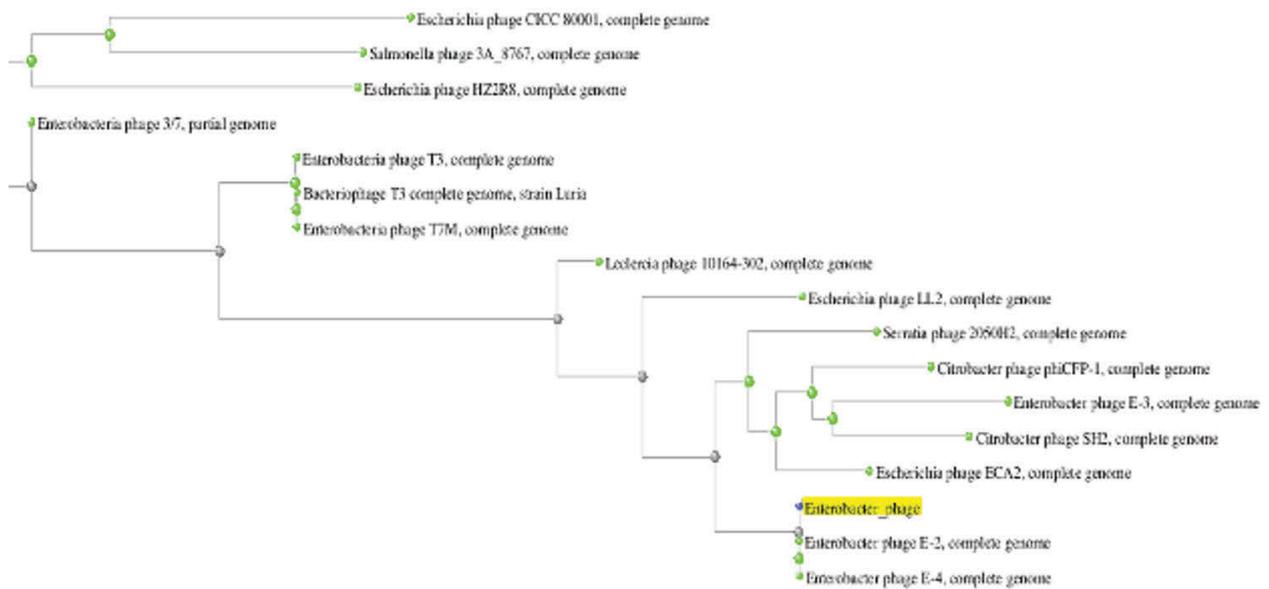


Рис. 3 - Филогенетическое дерево соответствия ДНК Enterobacter phage E7 возможным аналогиям

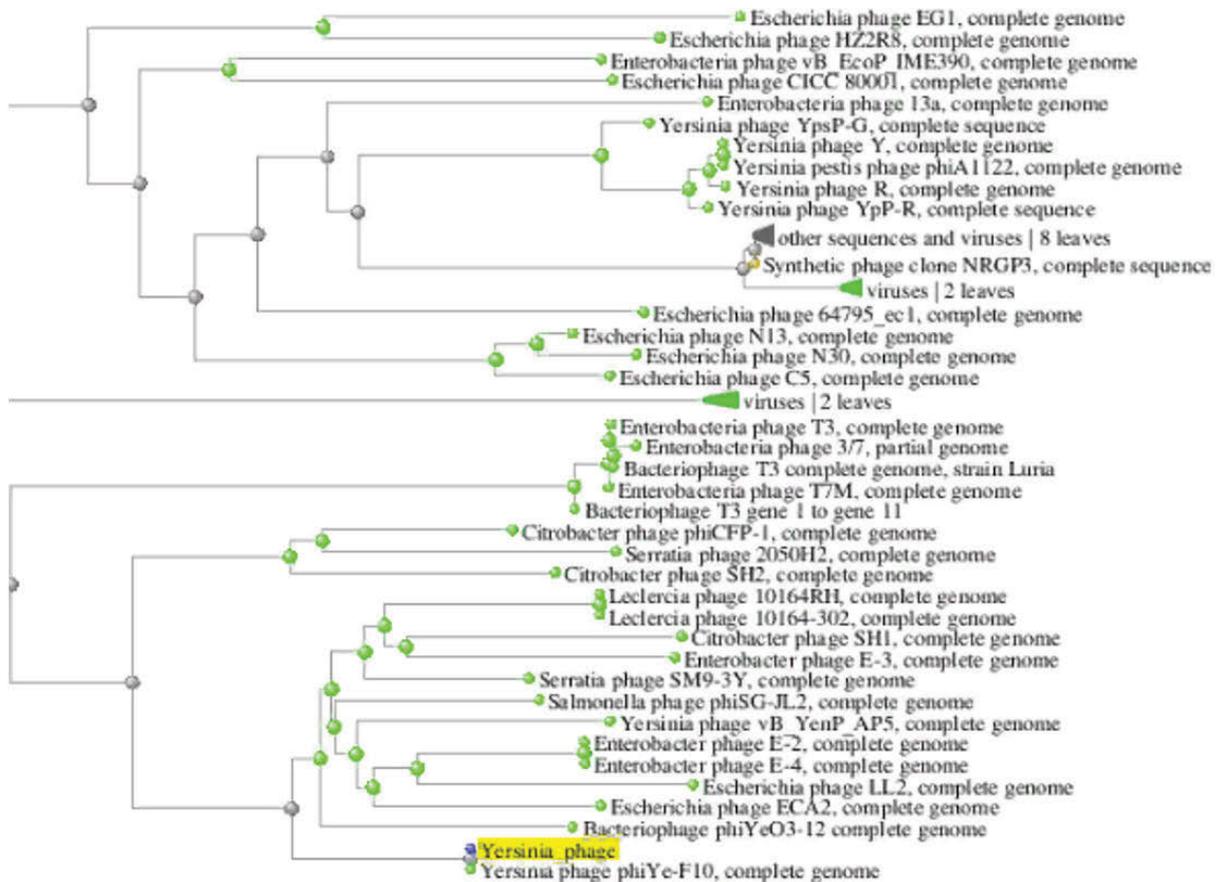


Рис. 4 - Филогенетическое дерево соответствия ДНК Yersinia phage Ye3-f2 возможным аналогиям

построены филогенетические деревья соответствия ДНК *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА), *Enterobacter phage* (E7), *Yersinia phage* Ye3-f2 возможным аналогиям (рис. 2-4).

Затем были определены фрагменты для разработки системы праймеров для целей генетической идентификации и определения типовой принадлежности к группе бактериофагов, активных в

отношении *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* и *Yersinia enterocolitica*. Установлено, что специфичный фрагмент для *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА) расположен в области генома 3700-4500 п.н.

При использовании системы BLAST были определены несколько пар праймеров (рис. 5 - 6).

После синтеза праймеров были проведены эксперименты (рис. 7) по индикации определяе-



Рис. 5 - Системы праймеров на последовательности ДНК *Proteus phage Pr 4* – УГСХА

мых фрагментов генома *Proteus phage Pr 4* – УГСХА, позволяющие проводить скрининг наличия бактериофага непосредственно в материале без этапов выделения и очистки.

Высокоспецифичных фрагментов, характерных только *Enterobacter phage E7* и *Yersinia phage Ye3-f2* в исследуемых геномах не было выявлено, однако были обнаружены области, позволяющие в совокупности детектировать геном данной группы. Так, фаги, аналогичные *Enterobacter phage*, можно обнаружить при одновременном выявлении двух областей 17500-18000 п.н. и 26500-27500 п.н., характерных только для них, а одновременное выявление двух области 2000-2500 п.н. и 24100-24300 п.н., характерно только для *Yersinia phage*.

В системе BLAST были определены 2 системы праймеров для одновременного выявления фрагментов генома, характерных для группы бактериофагов, активных в отношении *Enterobacter* и 2 системы праймеров - для бактериофагов, специфичных для бактерий *Yersinia enterocolitica*.

Далее были проведены эксперименты (рис. 8) по индикации определяемых фрагментов генома *Enterobacter phage E7* и *Yersinia phage Ye3-f2* (рис. 9) (обязательное наличие фрагментов, фланкируемых двумя системами праймеров), которые позволяют осуществлять анализ исследуемого материала на наличие бактериофага без этапов выде-

ления и очистки.

Выводы

В результате проведенных исследований были разработаны системы праймеров для ПЦР типирования бактериофагов *Protes*, *Enterobacter* и *Yersinia* групп, которые позволяют определять наличие бактериофагов, относящихся к определенным группам в материале, полученном из объектов окружающей среды и патологического материала без выделения чистой культуры.

Данная характеристика, наряду с высокой специфичностью, характерной для всех типов молекулярно-генетических исследований [12-15], позволяет использовать эти системы при скринингах бактериофагов указанных групп при детекции фрагмента генома размером 125 п.н. в области 3700-4500 п.н. ДНК *Proteus phage* (Pr 4 – УГСХА); размерами 294 и 431 п.н. в областях 17500-18000 и 26500-27500 п.н. соответственно ДНК *Enterobacter phage* (E7) и размерами 226 и 85 п.н. в областях 2000-2500 и 24100-24300 п.н. соответственно *Yersinia phage* (Ye3-f2).

Библиографический список

1. Dublanchet, A. The epic of phage therapy / A. Dublanchet, S. Bourne // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. - 2007. - V.18, No.1. - P.15-18.
2. Выделение бактериофагов, специфичных к *Vacillus anthracis* [Электронный ресурс] / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // БиоКиров-2015: сборник материалов III Международного форума. - 2015. - С. 10-12.
3. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностиче-

Primer pair 1										
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	AGCGCCCAATACCATACTATCA	Plus	23	4364	4386	59.67	43.48	4.00		2.00
Reverse primer	TGGTCTCTGTAACCTATGC	Minus	20	4488	4469	57.42	50.00	3.00		2.00
Internal oligo	TCAGCAGGGTCTACACCTTGAC	Plus	23	4417	4439	58.58	56.52			
Product length	125									
Products on intended target										
>K0948982.1 Proteus phage PM 116, complete genome										
product length =	125									
Forward primer	1	AGCGCCCAATACCATACTATCA	23							
Template		40217	40195						
Reverse primer	1	TGGTCTCTGTAACCTATGC	20							
Template		40093	40112						
Primer pair 2										
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
Forward primer	GGCCCAATACCATACTATCA	Plus	22	4365	4386	58.33	45.45	4.00		2.00
Reverse primer	GTTGGTCTCTGTAACCTATG	Minus	21	4490	4470	58.19	52.38	3.00		1.00
Internal oligo	TCAGCAGGGTCTACACCTTGAC	Plus	23	4417	4439	58.58	56.52			
Product length	126									
Products on intended target										
>K0948982.1 Proteus phage PM 116, complete genome										
product length =	126									
Forward primer	1	GGCCCAATACCATACTATCA	22							
Template		40216	40195						
Reverse primer	1	GTTGGTCTCTGTAACCTATG	21							
Template		40091	40111						

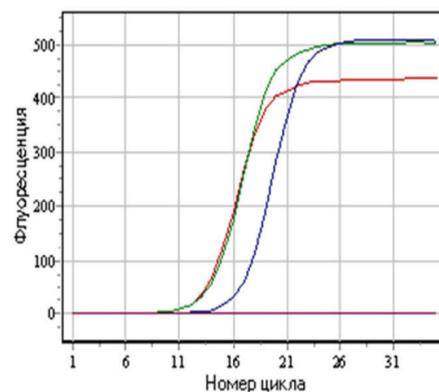
Рис. 6 - Дизайн праймеров на последовательности ДНК *Proteus phage Pr 4* – УГСХА

Качественный анализ

Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
A1	Образец_1	13,4		+
A2	Образец_2	13,9		+
A3	Образец_3	16,8		+
B2	Образец_4			-
D7	Образец_5			-
D8	К-			-

Рис. 7 - График амплификации специфических фрагментов при идентификации ДНК *Proteus phage*: образец 1 - Pr 4 - УГСХА, образец 2 - Pr 6 - УГСХА, образец 3 - Pr 7 - УГСХА

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера

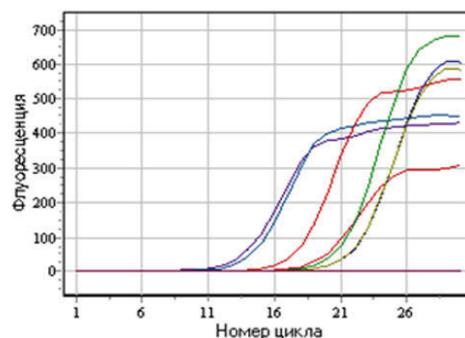


Качественный анализ

Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
A1	Образец_1	19,2		+
A2	Образец_2			-
A3	Образец_3	22,1		+
A4	Образец_4	21,9		+
B3	Образец_1	13,5		+
B4	Образец_2	14,2		+
B5	Образец_3	17,7		+
B6	Образец_4	21,0		+
C4	К-			-

Рис. 8 - График амплификации специфических фрагментов при идентификации ДНК *Enterobacter phage* в областях 17500-18000 п.н. и 26500-27500 п.н.: образец 1 - E3, образец 2 - E4, образец 3 - E6, образец 4 - E7

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера

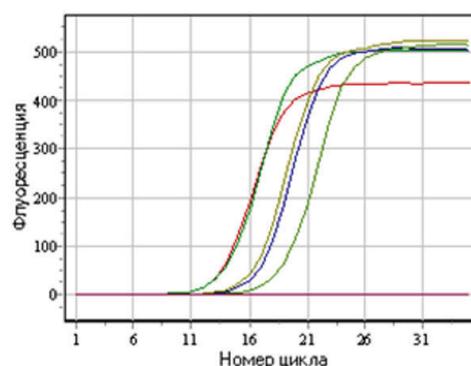


Качественный анализ

Номер лунки	Идентификатор пробирики	Ср. Fam	Ср. Hex	Результат
A1	Образец_1	13,6		+
A2	Образец_2	13,7		+
A3	Образец_3	16,9		+
A4	Образец_4	16,3		+
B1	Образец_1	19,0		+
B2	Образец_2			-
D6	Образец_3			-
D7	Образец_4			-
D8	К-			-

Рис. 9 - График амплификации специфических фрагментов при идентификации ДНК *Yersinia phage* в областях 2000-2500 п.н. и 24100-24300 п.н.: образец 1 - Ye3-f2, образец 2 - Ye2-f3, образец 3 - Ye1-f4, образец 4 - Ye2-f5

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера



ских биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дисс. ... д-ра биологических наук: 03.00.23 / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2007. - 39 с.

4. Нифонтова, В.В. Получение бактериофагов и их применение в ветеринарии // В.В. Нифонтова, О.Е. Чугунова // Вестник Пермского научного центра. - 2015. - № 2. - С. 54-59.

5. Bacteriophages. Methods and Protocols, / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne // Humana Press. - 2018. - Vol. 3. - 311 p.

6. Aleshkin, A.V. Bacteriophages in therapy and prevention of acute intestinal infections in children / A.V. Aleshkin, M.V. Zeigarnik, S.S. Bochkareva // Вопро-

сы практической педиатрии. - 2016. - Том 11, № 1. - С. 52-56.

7. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton: CRC Press, 2005. - 510 p.

8. Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в сельскохозяйственной ветеринарии [Электронный ресурс]: научная монография / Д. А. Васильев [и др.]. - Ульяновск: УлГАУ, 2019. - 1294 с.

9. Бактериофаги бактерий *Enterobacter* и их основные биологические свойства / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.И. Богданов // Вестник Ульяновской государственной сельскохо-

зйственной академии. – 2017. - № 4 (40). – С. 94-98.

10. Сульдина, Е.В. Выделение бактерий и бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 3 (39). – С. 50-55.

11. Феоктистова, Н.А. Протеиные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 4(40). – С. 75-80.

12. Генетическая характеристика и спектр антибактериальной активности бактериофагов, входящих в состав промышленных серий лекарственного препарата пиобактериофаг поливалентный очищенный / Н.В. Тикунова, Н.Н. Ворошилова, О.А. Польша, В.В. Морозова, А.Ю. Тикун, А.М.

Курильщиков, В.В. Власов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2016. - Том 15, № 2 (87). - С. 93-100.

13. Мирошников, Константин Анатольевич. Геномика и протеомика литических бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*: автореф. дис. ... д-ра химических наук: 03.01.04, 03.01.06 / К.А. Мирошников. – Москва, 2013. – 169с.

14. Вакарина, А.А. Бактериофаги. Современные аспекты их применения / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева // Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней: сборник научных работ. - Ижевск, 2016. - С. 28-35.

15. Conrotto, P. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications / P. Conrotto, S. Souchelnytskyi // Exp. Oncol. - 2008. - Vol. 30, № 3. - P. 171–180.

DEVELOPMENT OF PCR-DETECTION SYSTEMS OF BACTERIOPHAGES OF PROTEUS PHAGE (PR 4 - UGSKHA), ENTEROBACTER PHAGE (E7) AND YERSINIA PHAGE (YE3-F2)

Suldina E.V., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A., Mastilenko A.V.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: bacteriophage, Proteus phage, Enterobacter phage, Yersinia phage, PCR, detection, system, primers, phylogenetic tree

The article presents results of studies on development of PCR detection system of such bacteriophages as Proteus phage (Pr 4 - UGSKhA), Enterobacter phage (E7) and Yersinia phage (Ye3-F2). A phylogenetic tree was constructed to match their genetic organization with each other, and it was found that the correspondence between the genomes of Proteus phage (Pr 4 - UGSKhA), Enterobacter phage (E7) and Yersinia phage (Ye3-f2) is from 24 to 31%. It was determined that the specific fragment for Proteus phage (Pr 4 - UGSKhA) is located in the genome region of 3700-4500 bp. Highly specific fragments, characteristic only for Enterobacter phage E7 and Yersinia phage Ye3-f2, were not found in the studied genomes, however, areas were found that would allow only the genome of this group to be detected when PCR was used. Two areas were established, the simultaneous detection of which is characteristic for Enterobacter phage and for Yersinia phage. Primer systems were identified in the BLAST system for simultaneous detection of fragments of the genome characteristic of the group of bacteriophages studied. As a result of the studies, primer systems were developed for PCR typing of bacteriophages of the Proteus, Enterobacter and Yersinia groups, allowing to indicate bacteriophages belonging to certain groups in material obtained from environmental objects and pathological material without isolating pure culture in when screening the indicated groups in case of detection of a genome fragment of 125 bp in the range of 3700-4500 bp of DNA Proteus phage (Pr 4 - UGSKhA); sizes of 294 and 431 bp in the range of 17500-18000 and 26500-27500 bp respectively, Enterobacter phage DNA (E7) and sizes of 226 and 85 bp. in the range of 2000-2500 and 24,100-24300 bp - Yersinia phage (Ye3-f2), respectively.

Bibliography

1. Dublanchet, A. The epic of phage therapy / A. Dublanchet, S. Bourne // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. - 2007. - V.18, No.1. - P.15-18.
2. Isolation of bacteriophages specific for *Bacillus anthracis* [Electronic resource] / E.I. Klimushkin, N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev [et al.] // BioKirov-2015: a collection of materials of the III International forum. - 2015. - P. 10-12.
3. Zolotukhin, Sergey Nikolaevich. Creation and development of schemes for use of diagnostic biological products based on isolated and studied bacteriophages of enterobacteria: author's abstract of dissertation of Doctor of Biological Sciences: 03.00.23 / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk, 2007. - 39 p.
4. Nifontova, V.V. Obtaining bacteriophages and their use in veterinary medicine // V.V. Nifontova, O.E. Chugunova // Vestnik of Perm Scientific Center. - 2015. - № 2. - P. 54-59.
5. Bacteriophages. Methods and Protocols, / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne // Humana Press. - 2018. - Vol. 3. – 311 p.
6. Aleshkin, A.V. Bacteriophages in therapy and prevention of acute intestinal infections in children / A.V. Aleshkin, M.V. Zeigarnik, S.S. Bochkareva // Вопросы практической педиатрии. - 2016. - Том 11, № 1. - С. 52-56.
7. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton: CRC Press, 2005. - 510 p.
8. Genomics and biology of candidate bacteriophages for treatment of enterobacterial infections in agricultural veterinary medicine: monograph / D.A. Vasiliev [et al.]. - Ulyanovsk: UISAU, 2019. - 1294 p.
9. Bacteriophages of Enterobacter bacteria and their basic biological properties / E.V. Suldina, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin, I.I. Bogdanov // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - № 4 (40). - P. 94-98.
10. Suldina, E.V. Isolation of bacteria and bacteriophages of *Yersinia enterocolitica* / E.V. Suldina, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017. - № 3 (39). - P. 50-55.
11. Feoktistova, N.A. Protein bacteriophages: the study of some biological properties / N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2017 - № 4 (40). - P. 75-80.
12. Genetic characteristics and spectrum of antibacterial activity of bacteriophages included in the industrial series of the medication, named polyobacteriophage polyvalent purified / N.V. Tikunova, N.N. Voroshilova, O.A. Polygach, V.V. Morozova, A.Yu. Tikunov, A.M. Kurilshchikov, V.V. Vlasov // Epidemiology and vaccine prevention. - 2016. - Vol. 15, No. 2 (87). - P. 93-100.
13. Miroshnikov, Konstantin Anatolyevich. Genomics and proteomics of the lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages: author's abstract dissertation of Doctor of Chemical Sciences: 03.01.04, 01.03.06 / K.A. Miroshnikov. - M., 2013. - 52 p.
14. Vakarina, A.A. Bacteriophages. Modern aspects of their application / A.A. Vakarina, L.V. Kataeva // Major issues of infectious and parasitic diseases: Collection of scientific works. - Izhevsk, 2016. - P. 28-35.
15. Conrotto, P. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles of applications / R. Conrotto, S. Souchelnytskyi // Exp. Oncol. - 2008. - Vol. 30, No. 3. - P. 171–180.