

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ПРОТЕЙНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

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

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

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

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

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

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

e-mail: feokna@yandex.ru

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

Ключевые слова: *Proteus*, бактериофаги, геном, секвенирование, праймеры, терапевтические средства.

В статье представлена молекулярно-генетическая характеристика секвенированного бактериофага Pr – 6 УГСХА. Составлена карта линейной ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии их генов.

Разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Proteus ssp.* и предполагаемых для применения в качестве терапевтических средств для лечения энтеробактериальных инфекций, вызываемых вышеназванными штаммами бактерий, в ветеринарной медицине. По результатам экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *RelE* культур *Proteus spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме протейного бактериофага Pr – 6 УГСХА локусов патогенности выявлено не было. Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг Pr – 6 УГСХА, специфичный к бактериям видов *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, для конструирования терапевтического биопрепарата с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птицы.

Введение

Анализ литературных источников свидетельствует о том, что доля бактерий рода *Proteus* в тонком кишечнике молодняка сельскохозяйственных животных и птицы в хозяйствах, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, может составлять до пятидесяти процентов [1-3]. Невысокий процент летальности приводит к высоким экономическим затратам, так как снижение живой массы переболевших животных и птицы и понижение иммунного статуса в перспективе приводит к недополучению прироста на 1 кормовую единицу, или 1 рубль инвестиций [4].

Поиск экологически чистых и эффективных терапевтических средств для лечения и профилактики бактериальных инфекций не может исключать применение биопрепаратов на основе специфических бактериофагов [5-9]. Благодаря особенностям своей биологии бактериофаги могут являться мощными агентами горизонтального переноса генов от бактерии к бактерии. Бактери-

офаги, предназначенные для целей фаготерапии и фагопрофилактики инфекционных болезней, должны быть исследованы методами геномики для определения их потенциальной способности к переносу генов бактерий [10]. Основными путями переноса и экспрессии «генов вирулентности» бактериофагами является или лизогенная конверсия (в случае, когда геном умеренного фага содержит нежелательные гены), или фаговая трансдукция [11]. Гены, которые могут содержать бактериофаги и появление которых в геноме инфицированных бактерий может вызывать нежелательные явления (к примеру, повышенную вирулентность), можно разделить на несколько групп в соответствии с их продуктами: 1) гены внеклеточных токсинов; 2) гены, продукты которых участвуют в прикреплении и колонизации бактериями поверхностей; 3) гены ферментов, изменяющих серотип бактерий; 4) гены белков, помогающих инвазии бактерий в ткани. Разумеется, что наличие подобных генов в бактериофагах для целей

терапии и профилактики бактериальных заболеваний абсолютно недопустимо. Кроме отсутствия генов вирулентности, фаги должны быть также безусловно литическими (вирулентными) и не вызывать трансдукцию хозяйской ДНК [12-15].

Цель исследований – проведение молекулярно-генетических исследований протейных бактериофагов для подтверждения оригинальности, вирулентной природы и отсутствия локусов патогенности.

Объекты и методы исследований

Из 94 проб из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, было выделено 8 бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Proteus*. Установлено, что данные бактериофаги характеризовались показателем литической активности в диапазоне от $4,2 \pm 0,2 \times 10^6$ до $1,9 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл (по методу A. Gratia) и от 10^5 до 10^8 (по методу Аппельмана), были специфичны в пределах рода, обладали перекрестным лизисом в пределах видов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*. Совокупный процент лизиса восьми бактериофагов на 42 культурах составил 100 % [16-17].

Анализ изученных биологических свойств бактериофагов *Proteus* позволил нам выбрать для дальнейших исследований, направленных на изучение молекулярно-генетической характеристики, включающей определение размера фагового генома, бактериофаг Pr – 6 УГСХА. Работа была направлена на определение процента его идентичности с таксономически наиболее близкими бактериофагами, проверку отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции, и другие нежелательные локусы [18].

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома бактериофага использовали полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Штамм бактериофага был секвенирован трижды. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геном бактериофага с высокой достоверностью.

В исследованиях были использованы библиотеки баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей).

Для оптимизации ПЦР-протокола, в реакциях со штаммами *Proteus spp.*, был использован электрофоретический метод детекции продуктов амплификации.

Результаты исследований

На рис. 1 собранный геном сравнивали с из-

вестными ДНК бактериофагов, депонированных в GenBank NCBI, для определения кодирующих областей геномов.

В результате проведенных исследований была составлена карта линейной ДНК выделенного и селекционированного нами ранее бактериофага Pr – 6 УГСХА. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии их генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковым у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемых видов бактерий. В таблице 1 представлен биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага. На основе биоинформационного анализа данных сиквенса было доказано отсутствие локусов патогенности. Однако сама процедура секвенирования достаточно дорогая и трудоемкая, поэтому в данной работе мы поставили себе целью показать возможность использования метода ПЦР для доказательства отсутствия локусов патогенности в геноме бактериофага.

Следующим этапом исследований была разработка систем молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР – полимеразной цепной реакции) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Proteus spp.* и предполагаемых для применения в качестве терапевтических средств для лечения энтеробактериальных инфекций, вызываемых вышеназванными штаммами бактерий, в ветеринарной медицине.

На первом этапе в библиотеке баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) была определена уникальность гена-кандидата и выбран фрагмент, кодирующий ген *toxin RelE*.

После анализа в библиотеках баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) нуклеотидных последовательностей всех вышеуказанных генов, они были просканированы системой Blast базы данных GeneBank (США) на предмет совпадения с последовательностями ДНК известных микроорганизмов. Установлено, что данные генетические последовательности яв-

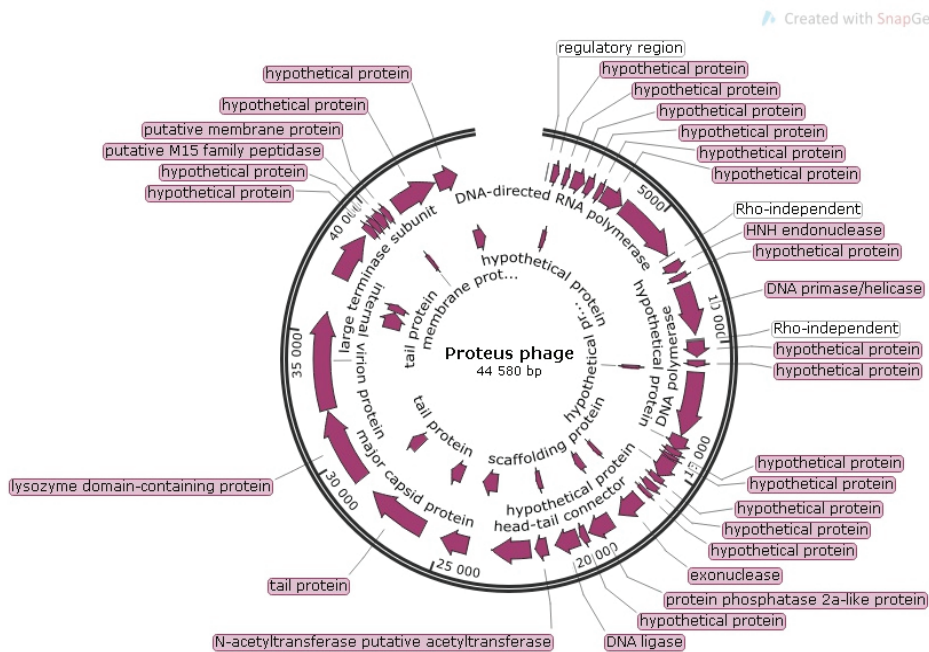


Рис. 1 - Карта линейной ДНК бактериофага *Proteus* с расшифровкой кодирующих областей генома

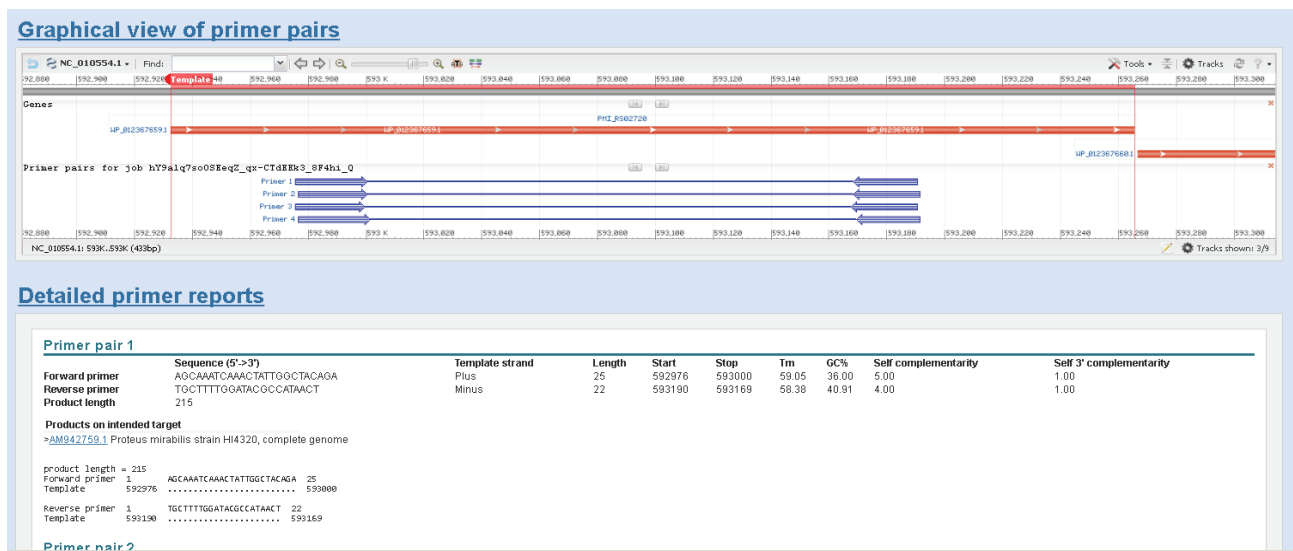


Рис.2 - Варианты праймерных систем для амплификации гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Proteus spp.*

ляются уникальными для *Proteus phage toxin RelE* и не имеют совпадений с другими видами микроорганизмов.

После выбора специфичного гена-кандидата для молекулярно-генетической идентификации «островка патогенности», носителем которого могут быть бактериофаги, активные в отношении *Proteus spp.*, были определены наиболее консервативные участки выбранных мишеней путем их сравнения у различных штаммов *Proteus phage* в базе данных GeneBank.

На эти консервативные участки приложением Primer BLAST этой базы данных в режиме online были положены праймеры, отвечающие не-

которым условиям, определенным нами: длина праймеров должна составлять 18–24 пары нуклеотидов, температура плавления праймера должна быть 60–70 °C, размер фланкируемого праймерами участка гена должна составлять не менее 100 и не более 1000 п.о.

После определения праймеров, они были выровнены программой Gene Runner Version 3.05, определены димеры, при возможном их некомплементарном связывании с самими собой или попарно. В окончательном варианте праймеры, теоретическая специфичность и фрагменты амплифицируемых участков представлены на рисунке 2 и в таблице 2.

Таблица 1

Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага *Proteus*

Sequence: *Proteus.gb* (Linear / 44 580 bp)
Features: 54 visible, 54 total

Feature	Location	Size	Color	Symbol	Type
✓ source	1 .. 44 580	44 580 bp		⊢	source
✓ regulatory region	403 .. 422	20 bp		⊢	regulatory
✓ hypothetical protein	607 .. 882	276 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	845 .. 1096	252 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	1096 .. 1305	210 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	1463 .. 1963	501 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	2028 .. 2357	330 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	2536 .. 2754	219 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	2825 .. 3670	846 bp	■	→	CDS
✓ DNA-directed RNA polyme...	3744 .. 6371	2628 bp	■	→	CDS
✓ Rho-independent	6383 .. 6424	42 bp		⊢	regulatory
✓ HNH endonuclease	6674 .. 7087	414 bp	■	→	CDS HNH endonucle...
✓ hypothetical protein	7219 .. 7437	219 bp	■	→	CDS
✓ DNA primase/helicase	7647 .. 9635	1989 bp	■	→	CDS
✓ Rho-independent	9815 .. 9858	44 bp		⊢	regulatory
✓ hypothetical protein	9883 .. 10 494	612 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	10 636 .. 10 887	252 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	10 951 .. 11 115	165 bp	■	→	CDS
✓ DNA polymerase	11 099 .. 13 651	2553 bp	■	→	CDS DNA polymerase
✓ hypothetical protein	13 690 .. 14 235	546 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	14 238 .. 14 468	231 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	14 487 .. 14 642	156 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	14 655 .. 15 461	807 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	15 465 .. 15 689	225 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	15 792 .. 16 115	324 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	16 187 .. 16 339	153 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	16 406 .. 16 651	246 bp	■	→	CDS
✓ exonuclease	16 597 .. 17 631	1035 bp	■	→	CDS exonuclease
✓ endonuclease	17 616 .. 18 026	411 bp	■	→	CDS endonuclease
✓ protein phosphatase 2a-lik...	18 019 .. 19 026	1008 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	19 097 .. 19 402	306 bp	■	→	CDS
✓ DNA ligase	19 497 .. 20 438	942 bp	■	→	CDS DNA ligase
✓ hypothetical protein	20 314 .. 20 625	312 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	20 498 .. 20 761	264 bp	■	→	CDS
✓ N-acetyltransferase putati...	20 761 .. 21 255	495 bp	■	→	CDS
✓ head-tail connector	21 436 .. 22 986	1551 bp	■	→	CDS
✓ scaffolding protein	22 986 .. 23 867	882 bp	■	→	CDS
✓ major capsid protein	23 941 .. 25 053	1113 bp	■	→	CDS
✓ tail protein	25 182 .. 25 910	729 bp	■	→	CDS tail protein
✓ tail protein	25 852 .. 28 317	2466 bp	■	→	CDS tail protein
✓ internal virion protein	28 317 .. 28 994	678 bp	■	→	CDS
✓ lysozyme domain-containi...	29 003 .. 31 954	2952 bp	■	→	CDS
✓ internal virion protein	32 022 .. 35 843	3822 bp	■	→	CDS
✓ tail protein	35 843 .. 36 802	960 bp	■	→	CDS tail protein
✓ small terminase subunit	36 870 .. 37 292	423 bp	■	→	CDS
✓ large terminase subunit	37 292 .. 39 190	1899 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	39 357 .. 39 632	276 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	39 644 .. 39 913	270 bp	■	→	CDS
✓ putative M15 family peptid...	39 923 .. 40 276	354 bp	■	→	CDS
✓ putative membrane protein	40 303 .. 40 527	225 bp	■	→	CDS
✓ membrane protein	40 520 .. 40 717	198 bp	■	→	CDS membrane prot...
✓ hypothetical protein	40 831 .. 42 675	1845 bp	■	→	CDS
✓ hypothetical protein	42 734 .. 43 606	873 bp	■	→	CDS

Printed from SnapGene® Viewer: ноя 19, 2017 22:18 Page 1

Таблица 2

Характеристика праймеров к участкам гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Proteus spp.*

Параметр	Характеристика
участок гена <i>toxin RelE</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	AGCAAATCAAACATTTGGCTACAGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	TGCTTTTGGATACGCCATAACT
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	59,9°C
Теоретическая специфичность	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris RelE gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	215

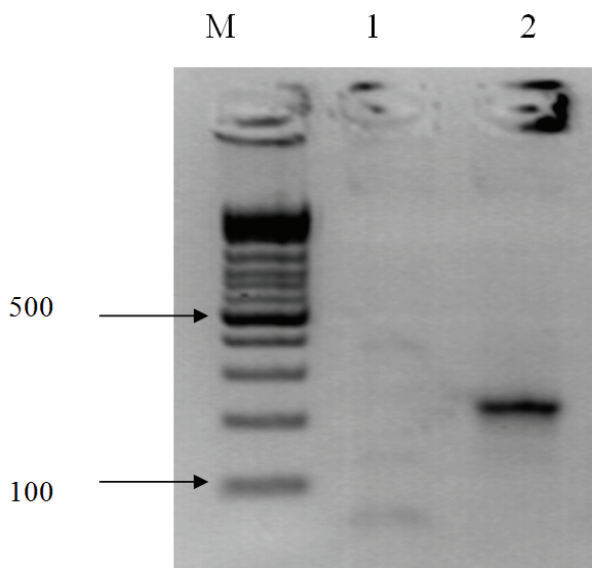


Рис. 3 - Индикация фрагмента гена *RelE*:

М – маркер молекулярного веса, *1* – ДНК бактериофага *FPr – 13* УГСХА, специфичного в отношении *Proteus spp.*, *2* – положительный контроль

щий ген *toxin RelE*. Характеристика праймеров к участкам гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Proteus spp.*: прямой праймер (f) 5'-3' – AGCAAATCAAACATTTGGCTACAGA; обратный праймер (r) 5'-3' – TGCTTTTGGATACGCCATAACT; расчетная температура плавления прямого праймера - 60,0 °C; расчетная температура плавления обратного праймера - 59,9 °C; теоретическая специфичность - *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris RelE gene*; длина амплифицируемого участка (п.о.) – 215. По результатам экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *RelE* культур *Proteus spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме протейного бактериофага *Pr – 6* УГСХА локусов патогенности выявлено не было.

Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг *Pr – 6* УГСХА, специфичный к бактериям видов *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, для конструирования терапевтического биопрепарата с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птицы

Библиографический список

1. Сравнительная возрастная динамика становления микробиоценоза слепой кишки кур и перепелов / М.В Каминская, О.М. Стефанышин, Г.И. Нечай, Н.И. Борецкая, С.В. Гураль, И.Н. Попык, Н.И. Цепко, В.В. Литвин // *Биология животных*. - 2014. - Т. 16, № 4. - С. 50-58.
2. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н.

Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – 130 с.

3. Шмидт, Г.О. Биологические свойства микроорганизмов, выделенных из толстого кишечника перепелов в норме и при дисбактериозе / Г.О. Шмидт, Г.О. Плешакова // *Ветеринарная патология*. - 2012. - Т. 39, № 1. - С. 61-63.

4. Состояние кишечного микробиоценоза телят при острых кишечных расстройствах / А.В. Куразеева, В.А. Коноплёв, Л.А. Лаврушина, И.С. Шульга // *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*. - 2015. - № 12. - С. 173-177

5. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дисс. ...д-ра биологических наук: 03.00.07, 03.00.23 / С. Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 341с.

6. Использование бактериофагов для борьбы с колибактериозом и кампилобактериозом в птицеводстве [Электронный ресурс] / А.А. Зимин, Ф.В. Кочетков, С.И. Кононенко [и др.] // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета* – 2016. – №123. - С. 421 – 432. – IDA [article ID]: 1231609029. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2016/09/pdf/29.pdf>.

7. Golkar, Z. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis / Z. Golkar, O. Bagasra, D.G. Pace // *J. Infect. Dev. Ctries*. - 2014. - Т. 8, № 2. - P. 129-36.

8. Асланов, Батырбек Исмелович. Эпидемиологическая оценка бактериофагов как факторов эволюции госпитальных штаммов и средств борьбы с внутрибольничными инфекциями: дисс. ...д-ра медицинских наук: 14.02.02 / Б.И. Асланов. – Санкт-Петербург, 2016. – 226с.

9. Красильников, И.В. Роль бактериофагов в терапии бактериальных инфекций / И.В. Красильников // *Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности*. Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2016. - С. 74-75.

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

11. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavi-gne. - Humana Press, 2018. – 311 p.

12. Borysowski, J. Phage Therapy: Current Research and Application / J. Borysowski, R. Miedzybrozki, A. Gorski (Eds.). - Warsaw, 2014. - 378 p.

13. Knoll, B.M. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview / B.M. Knoll, E. Mylonakis E. // *Clin. Infect. Dis*. - 2014. -

Т. 58, № 4. - P. 528-34.

14. Поиск новых генетических детерминант *Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis* / А.В. Дмитриев, А.М. Киселев, А.Г. Киреева [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 2. – С. 42-50.

15. Распространение генов комплекса immune evasion cluster и других факторов вирулентности у *Staphylococcus aureus* / В.В. Гостев, А.Е. Гончаров, М.А. Грачева, С.В. Сидоренко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т.15, № 4. – С.270-278.

16. Феоктистова, Н.А. Выделение бактериофагов рода *Proteus* и подбор параметров культивирования / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 2 (38). – С. 90-106.

17. Феоктистова, Н.А. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 3 (39). – С. 99-105.

18. Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)2-HigB toxin-antitoxin complex / М.А. Schureck, Т. Maehigashi, S.J. Miles, J. Marquez, S.E. Cho, R. Erdman, C.M. Dunham // J. Biol. Chem. – 2014. – V. 289 (2). – P. 1060-1070.

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF STRAINS OF PROTEUS BACTERIOPHAGES

Vasilyev D.A., Feoktistova N.A., Suldina E.V.
Mastilenko A.V.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU
432017, Ulyanovsk, Novyy Venets Boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: *Proteus*, bacteriophages, genome, sequencing, primers, therapeutic agents

The molecular genetic characteristic of the sequenced bacteriophage Pr-6 UGSKhA is presented in the article. A map of linear DNA has been compiled with the decoding of the genome coding regions. Expression products of their genes have been determined in accordance with known analogs. A system of molecular genetic indication (using PCR) of autonomous genetic elements (islets of pathogenicity) in the genomes of bacteriophages active against *Proteus* spp. has been developed and they are supposed to be used as therapeutic agents for the treatment of enterobacterial infections caused by the above strains of bacteria in veterinary medicine. Based on the results of experimental studies of indication of a specific fragment of the RelE gene of *Proteus* spp. with the developed systems of oligonucleotides in the genome of *Proteus* bacteriophage Pr-6 UGSKhA, pathogenicity loci were not revealed. The data obtained make it possible to recommend the bacteriophage Pr-6 UGSKhA specific to *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* bacteria for the construction of a therapeutic biological agent for prevention and treatment of gastrointestinal diseases of young farm animals and poultry.

Bibliography

1. Comparative age dynamics of formation of blind gut microbiocenosis of chickens and quails / M.V. Kaminskaya, O.M. Stepanyshin, G.I. Nechay, N.I. Boretskaya, S.V. Gural, I.N. Popyk, N.I. Tsepko, V.V. Litvin // *Biology of animals*. - 2014. - V. 16, № 4. - P. 50-58.
2. Zolotukhin, S.N. Little studied enterobacteria and their role in the pathology of animals / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: Copyring, 2004. - 130 p.
3. Schmidt, G.O. Biological properties of microorganisms isolated from the large intestine of quails in normal and in case of dysbacteriosis / G.O. Schmidt, G.O. Pleshakova // *Veterinary pathology*. - 2012. - V. 39, № 1. - P. 61-63.
4. The state of intestinal microbiocenosis of calves in case of acute intestinal disorders / A.V. Kurazeeva, V.A. Konoplev, L.A. Lavrushina, I.S. Shulga // *Vestnik of Krasnoyarsk State Agrarian University*. - 2015. - № 12. - P. 173-177
5. Zolotukhin, Sergey Nikolaevich. Elaboration and development of schemes for application of diagnostic biological compounds on the basis of isolated and studied bacteriophages of enterobacteria: dissertation of Doctor of Biological Sciences: 03.00.07, 03.00.23 / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk, 2007. – 341p.
6. Usage of bacteriophages for controlling colibacteriosis and campylobacteriosis in poultry farming [Electronic resource] / A.A. Zimin, F.V. Kochetkov, S.I. Kononenko [et al.] // *Polythematic network electronic scientific journal of Kuban State Agrarian University* - 2016. - №123. - P. 421 - 432. - IDA [article ID]: 1231609029. - Access mode: <http://ej.kubagro.ru/2016/09/pdf/29.pdf>.
7. Golkar, Z. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis / Z. Golkar, O. Bagasra, D.G. Pace // *J. Infect. Dev. Ctries*. - 2014. - V. 8, № 2. - P. 129-36.
8. Aslanov, Batyrbek Ismelovich. Epidemiological assessment of bacteriophages as factors of hospital strain evolution of and means of combating nosocomial infections: dissertation of Doctor of Medicine: 14.02.02 / B.I. Aslanov. - St. Petersburg, 2016. – 226p.
9. Krasilnikov, I.V. The role of bacteriophages in the therapy of bacterial infections / I.V. Krasilnikov // *Bacteriophages: theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry. Materials of the third scientific and practical conference with international participation*. - Moscow, 2016. - P. 74-75.
10. Kutter, E. *Bacteriophages: biology and applications* / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
11. *Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3* / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.
12. Borysowski, J. *Phage Therapy: Current Research and Application* / J. Borysowski, R. Miedzobrozki, A. Gorski (Eds.). - Warsaw, 2014. - 378 p.
13. Knoll, B.M. Antibacterial bioagents based on principles of bacteriophage biology: an overview / B.M. Knoll, E. Mylonakis E. // *Clin. Infect. Dis*. - 2014. - T. 58, № 4. - P. 528-34.
14. Search for new genetic determinants of *Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis* / A.V. Dmitriev, A.M. Kiselev, A.G. Kireeva [et al.] // *Medical academic journal*. - 2016. - V. 16, № 2. - P. 42-50.
15. Expansion of immune evasion cluster genes and other virulence factors of *Staphylococcus aureus* / V.V. Gostev, A.E. Goncharov, M.A. Gracheva, S.V. Sidorenko // *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. - 2013. - V.15, № 4. - P.270-278.
16. Feoktistova, N.A. Isolation of bacteriophages of *Proteus* genus and selection of cultivation parameters / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2017. - № 2 (38). - P. 90-106.
17. Feoktistova, N.A. Study of biological properties of bacteriophages of *Proteus* genus / N.A. Feoktistova, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. - 2017. - №3 (39). - P. 99-105.
18. Structure of the *Proteus vulgaris* HigB-(HigA)2-HigB toxin-antitoxin complex / M.A. Schureck, T. Maehigashi, S.J. Miles, J. Marquez, S.E. Cho, R. Erdman, C.M. Dunham // *J. Biol. Chem*. – 2014. – V. 289 (2). – P. 1060-1070.