

doi:10.18286/1816-4501-2025-3-108-113

УДК 579.842.23:616-097

## Изучение неочищенных белковых фракций псевдотуберкулёзного микроба для получения диагностических антител разной специфической направленности

С. В. Иващенко<sup>1✉</sup>, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология и биотехнология»

М. Н. Киреев<sup>2</sup>, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории «Холерные вакцины»

А. О. Грунова<sup>3</sup>, ветеринарный врач

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО "Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова"

<sup>1</sup> 410012, г. Саратов, пр-кт им. Петра Столыпина, зд. 4, стр. 3;

✉ ivashenko-sv@mail.ru

<sup>2</sup> ФКУН РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора

410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

<sup>3</sup> ООО "Первая ветеринарная клиника"

<sup>3</sup> 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 98

**Резюме.** Цель исследования – изучение неочищенных белковых фракций двух антигенных препаратов для определения возможности их использования при получении диагностических гипериммунных сывороток разной специфичности. Были исследованы диметилсульфоксид-антиген *Y. pseudotuberculosis* (ДА *Y. pseudotuberculosis*) и дезинтегрированные мембраны *Y. pseudotuberculosis* (ДМ *Y. pseudotuberculosis*). ДА *Y. pseudotuberculosis* получали в результате извлечения из целых микробных клеток антигенных субстанций при помощи диметилсульфоксида. ДМ *Y. pseudotuberculosis* были получены путём разрушения клеточных стенок бактерий додецилсульфатом натрия. Соотношение белков и углеводов для ДА *Y. pseudotuberculosis* составляло 30:1, а для ДМ *Y. pseudotuberculosis* – 7,5:1. В составе ДА *Y. pseudotuberculosis* преобладают белки с молекулярными массами: 45, 38, 20 и 17 кДа, а в ДМ *Y. pseudotuberculosis* – белки с молекулярными массами: 45, 38 и 23 кДа. Из перечисленных белков в наибольшем количестве в обоих антигенах содержится белок 38 кДа. Оба антигена *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной активизации клеточного и гуморального иммунных ответов у белых мышей. В ДА *Y. pseudotuberculosis* за образование антител отвечают родоспецифические иерсиниозные белки, а в ДМ *Y. pseudotuberculosis*, основной антителообразующей активностью обладают белки с видовой псевдотуберкулёзной специфичностью. Сыворотка к ДА *Y. pseudotuberculosis* взаимодействовала в иммуноблоттинге с белками из родственного антигена, имеющими молекулярные массы 45, 38, 32, 28 кДа, а сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* взаимодействовала с белками молекулярных масс 38, 45, 58, 66 кДа. Неочищенные фракции белков с молекулярными массами 38 и 45 кДа могут в зависимости от способа получения антигена содержать в себе преимущественно родоспецифические или видоспецифические белки-порины и использоваться для получения диагностических антител разной специфической направленности.

**Ключевые слова:** *Yersinia pseudotuberculosis*, дезинтегрированные мембраны, диметилсульфоксид-антиген, белки-порины.

**Для цитирования:** Иващенко С. В., Киреев М. Н., Грунова А. О. Изучение неочищенных белковых фракций псевдотуберкулёзного микроба для получения диагностических антител разной специфической направленности // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2025. № 3 (71). С. 108-113. doi:10.18286/1816-4501-2025-3-108-113

## Study of unpurified protein fractions of the pseudo-tuberculosis microbe to obtain diagnostic antibodies of different specific directions

S. V. Ivaschenko<sup>1✉</sup>, M. N. Kireev<sup>2</sup>, A. O. Grunova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> FSBEI HE "Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov"

410012, Saratov, Pyotr Stolypin Ave., bldg. 4, bldg. 3;

✉ ivashenko-sv@mail.ru

<sup>2</sup> Federal State Scientific Institution Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe" of Russian Federal State Agency for Health and Consumer Rights

<sup>2</sup> 410005, Saratov, Universitetskaya St., Bldg. 46

<sup>3</sup> ООО "First Veterinary Clinic"

<sup>3</sup> 410012, Saratov, Astrakhanskaya St., Bldg. 98

**Abstract.** The aim of the study was to examine the crude protein fractions of two antigen preparations to determine the possibility of using them to obtain diagnostic hyperimmune sera of different specificity. The dimethyl sulfoxide antigen of *Y. pseudotuberculosis* (DA *Y. pseudotuberculosis*) and disintegrated membranes of *Y. pseudotuberculosis* (DM *Y. pseudotuberculosis*) were studied. DA *Y. pseudotuberculosis* was obtained by extracting antigen substances from whole microbial cells using dimethyl sulfoxide. DM *Y. pseudotuberculosis* were obtained by disrupting bacterial cell walls with sodium dodecyl sulfate. The protein to carbohydrate ratio for DA *Y. pseudotuberculosis* was 30:1, while for DM *Y. pseudotuberculosis* it was 7.5:1. DA *Y. pseudotuberculosis* had more proteins with molecular weights of 45, 38, 20, and 17 kDa, while DM *Y. pseudotuberculosis* had more proteins with molecular weights of 45, 38, and 23 kDa. Of the listed proteins, the 38 kDa protein was found in the greatest quantity in both antigens. Both *Y. pseudotuberculosis* antigens significantly activated cellular and humoral immune responses of white mice. Genus-specific *Yersinia* proteins are responsible for antibody formation in DA *Y. pseudotuberculosis*, while, as for DM *Y. pseudotuberculosis*, the main antibody-forming activity is possessed by proteins with species *pseudotuberculosis* specificity. Serum to DA *Y. pseudotuberculosis* interacted in immunoblotting with proteins from the related antigen having molecular masses of 45, 38, 32, 28 kDa, while serum to DM *Y. pseudotuberculosis* interacted with proteins of molecular masses of 38, 45, 58, 66 kDa. Unpurified fractions of proteins with molecular masses of 38 and 45 kDa may, depending on the method of obtaining the antigen, contain predominantly genus-specific or species-specific porin proteins and be used to obtain diagnostic antibodies of different specific directions.

**Keywords:** *Yersinia pseudotuberculosis*, disintegrated membranes, dimethyl sulfoxide antigen, porin proteins.

**For citation:** Ivaschenko S. V., Kireev M. N., Grunova A. O. Study of unpurified protein fractions of the pseudo-tuberculosis microbe to obtain diagnostic antibodies of different specific directions // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2025.3 (71): 108-113 doi:10.18286/1816-4501-2025-3-108-113

## Введение

Клеточная стенка псевдотуберкулёзного микроба (*Yersinia pseudotuberculosis*) содержит большое количество антигенов, которые могут обладать видовой (псевдотуберкулёзной) или родовой (иерсиниозной) специфичностью. Антигены с родовой специфичностью, кроме псевдотуберкулёза, могут быть использованы также для диагностики кишечного иерсиниоза, возбудителем которого является *Yersinia enterocolitica* [1].

Наиболее часто для конструирования псевдотуберкулёзных диагностических препаратов используют липополисахаридный O-антиген (ЛПС) или видоспецифические белки-порины с молекулярными массами 38-40 кДа [1, 2].

Препараты способные определять сразу псевдотуберкулёзные и кишечноиерсиниозные антитела создают на основе группы белков Yop (*Yersinia* outer membrane protein, белки наружной стенки иерсиний), образуемых иерсиниями при повышенной температуре 37 °C [3]. Однако некоторые белки-порины также обладают родовой специфичностью [2], что определяет их перспективность для создания родоспецифических диагностикомов.

Помимо создания антигенных диагностических препаратов, такие антигены, как ЛПС, белок инвазин с молекулярной массой 103 кДа, и белки Yop, могут быть применены для получения гипериммунных диагностических сывороток, также используемых для создания уже антительных диагностических препаратов [1].

Все антигены перед использованием, как правило, подвергаются очистке от посторонних белков и

углеводов, способных изменить специфичность получаемых диагностических препаратов или гипериммунных сывороток. Часто такая очистка и её контроль требуют специального оборудования, дорогих расходных материалов, высокой квалификации персонала [2]. Поэтому поиск возможности применения слабо очищенных антигенов является актуальной задачей.

Следует также отметить, что совместная циркуляция разных видов иерсиний у сельскохозяйственных животных требует комплексного применения родо- и видоспецифических диагностических препаратов [4]. Это определяет необходимость одновременного изучения антигенов разной специфичности для последующего их использования при создании диагностических тест-систем.

Нами были получены два неочищенных антигенных препарата псевдотуберкулёзного микроба, которые планируется использовать для получения диагностических гипериммунных сывороток различной специфичности:

диметилсульфоксид-антиген *Y. pseudotuberculosis* (ДА *Y. pseudotuberculosis*) и дезинтегрированные мембраны *Y. pseudotuberculosis* (ДМ *Y. pseudotuberculosis*). ДА *Y. pseudotuberculosis* получен в результате извлечения из целых микробных клеток антигенных субстанций при помощи диметилсульфоксида (ДМСО). ДМ *Y. pseudotuberculosis* получены путём разрушения клеточных стенок бактерий додецилсульфатом натрия (SDS) и содержат белковые антигены и ЛПС.

Цель исследования – изучение белковых фракций препаратов ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis* для определения возможности их использования при получении

диагностических гипериммунных сывороток с разной специфичностью.

**Материалы и методы**

ДА и ДМ выделяли из штамма *Y. pseudotuberculosis* III O:3 сероварианта. Все бактериальные культуры, использованные в работе, были получены из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ РосНИПЧИ "Микроб". Иерсинии выращивали в течение 2 суток на мясопептонном агаре при температуре 24 °С.

ДА *Y. pseudotuberculosis* получали из обработанных ацетоном и высушенных бактерий, которые затем подвергали воздействию ДМСО. После извлечения антигена из бактерий его освобождали от избытка ДМСО диализом в карбонатном буферном растворе [5, 6].

Процесс получения ДМ состоял из разрушения клеток *Y. pseudotuberculosis* ультразвуком, обработки отмытых клеточных стенок 2%-м раствором SDS и освобождением антигена от избытка SDS путём диализа в проточной воде [7, 8].

Соотношения белков и углеводов в антигенах определяли соответственно методом М.М. Bradford, 1976 [9] и фенольным методом [10].

Состав белков в полученных препаратах изучали методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с SDS по U.K. Laemmli, 1970 [11]. Окраску геля проводили Кумасси синим R-250.

Иммунизацию белых мышей растворами ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis* проводили внутривенно объёмом 0.25 мл в дозах: 500, 250, 125, 63, 31, 16 мкг/животное (по 3 мыши на дозу для каждого антигена). Антиген смешивали с 0.25 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). В качестве отрицательного контроля для инъекции использовали 0.01М фосфатный буферный раствор. Двукратную иммунизацию проводили с интервалом в 10 дней.

Через 10 дней после второй иммунизации у мышей из брюшной полости извлекали перитонеальные макрофаги, у которых замеряли дыхательную активность [12]. Собранная из шейных сосудов кровь была использована для определения антител методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетах [13].

Пятикратную гипериммунизацию кроликов проводили с интервалами в 14 дней. 1 мл смеси антигена и ПАФ (1:1) вводили животному подкожно вдоль спины в 3-4 точки. Количество антигена на кролика составляло 2 мг. Кровь брали из ушной вены через 14 суток после последней иммунизации [6, 8] и исследовали в ИФА.

Иммуноблоттинг проводили по методу H. Towbin et al., 1979 [14] с использованием сыворотки, полученной к ДА или ДМ *Y. pseudotuberculosis* в разведении 1:200, а также конъюгата – антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена (производства ООО фирмы "Имтек", г. Москва).

**Результаты**

Известно, что основными структурными компонентами бактериальной клетки являются белки и

углеводы, поэтому нами было определено их количество в антигенах. Соотношение белков и углеводов для ДА *Y. pseudotuberculosis* составляло 30:1, а для ДМ *Y. pseudotuberculosis* – 7,5:1. Это указывает на явное преобладание белков в обоих изучаемых нами антигенах.

Для определения белкового спектра ДА *Y. pseudotuberculosis* (ДА Y. p.) и ДМ *Y. pseudotuberculosis* (ДМ Y. p.) нами был проведён их электрофорез. В качестве препарата сравнения изучали также лизат целых псевдотуберкулёзных клеток (ЦК Y. p.) (Рисунок 1).

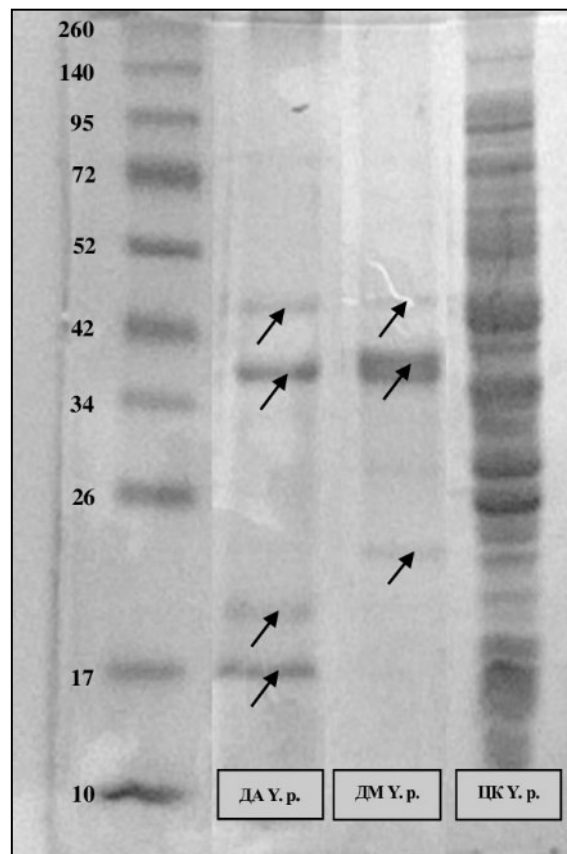


Рис. 1. Электрофорез белков *Y. pseudotuberculosis*

Как видно из рисунка 1, белки, изучаемых антигенов, составляют только часть от всех клеточных белков *Y. pseudotuberculosis*. В составе ДА *Y. pseudotuberculosis* преобладают белки с молекулярными массами: 45, 38, 20 и 17 кДа, а в ДМ *Y. pseudotuberculosis* – белки с молекулярными массами: 45, 38 и 23 кДа. Из перечисленных белков в наибольшем количестве в обоих антигенах содержится белок 38 кДа.

С целью оценки антигенной активности ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis* нами была проведена иммунизация ими белых мышей. Клеточная иммунная реакция у иммунизированных мышей определялась нами по дыхательной активности их перитонеальных макрофагов. Гуморальная иммунная реакция наблюдалась по изменению титров специфических антител в крови животных. (табл. 1).

**Таблица 1. Иммунизация белых мышей ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis***

Иммунизирующие дозы антигенов, мкг/мышь	Концентрация формазана на макрофаг, г		Титры антител в ИФА с антигенами	
	ДА <i>Y. p.</i>	ДМ <i>Y. p.</i>	ДА <i>Y. p.</i>	ДМ <i>Y. p.</i>
500	$10,5 \times 10^{-10}$	$12,2 \times 10^{-10}$	1:25600	1:12800
250	$9,7 \times 10^{-10}$	$11,6 \times 10^{-10}$	1:12800	1:12800
125	$8,8 \times 10^{-10}$	$10,4 \times 10^{-10}$	1:12800	1:6400
63	$7,3 \times 10^{-10}$	$8,7 \times 10^{-10}$	1:6400	1:6400
31	$5,6 \times 10^{-10}$	$5,8 \times 10^{-10}$	1:6400	1:3200
16	$3,6 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^{-10}$	1:3200	1:1600
0	$1,6 \times 10^{-10}$		1:400	

**Таблица 2. Специфичность гипериммунных сывороток, полученных к ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis***

Использованные бактерии		Сыворотки, полученные к антигенам	
		ДМ <i>Y. p.</i>	ДА <i>Y. p.</i>
		Титры антител	
<i>Y. pseudotuberculosis</i> и их сероварианты	O:1	1:25600	1:51200
	O:3	1:25600	1:51200
	O:4	1:12800	1:12800
	O:5	1:25600	1:6400
<i>Y. enterocolitica</i> и их сероварианты	O:3	1:200	1:25600
	O:5	1:200	1:25600
	O:6	1:200	1:6400
	O:9	1:200	1:25600
<i>Y. frederiksenii</i>		1:200	1:12800
<i>Y. kristensenii</i>		1:100	1:6400
<i>Y. intermedia</i>		1:200	1:12800
<i>Escherichia coli</i>		1:400	1:400
<i>Salmonella typhimurium</i>		1:100	1:100
<i>Proteus vulgaris</i>		1:400	1:200
<i>Enterobacter aerogenes</i>		1:200	1:200
<i>Brucella abortus</i>		1:200	1:200

Оба антигена *Y. pseudotuberculosis* способствуют значительной активизации клеточного и гуморального иммунных ответов (табл. 1). Оптимальной иммунизирующей дозой для обоих антигенов является 63 мкг/мышь, т.к. при более высоких дозах динамика роста антителообразования и дыхательной активности макрофагов замедляется (табл. 1). Пересчёт величины иммунизирующей дозы с мыши на кролика составляет 2 мг [15].

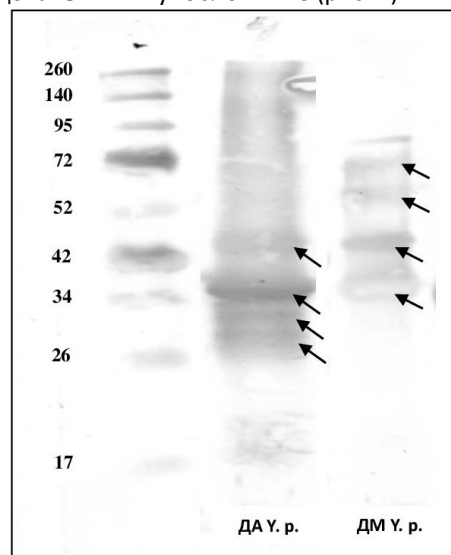
Для исследования специфичности антител, полученных к ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis*, нами была проведена пятикратная иммунизация кроликов данными антигенами (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что в ДА *Y. pseudotuberculosis* за образование антител отвечают родоспецифические иерсиниозные белки. Это хорошо демонстрируют высокие титры антител с клетками всех видов иерсиний: с *Y. pseudotuberculosis* – 1:6400-1:51200, с *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* и *Y. intermedia* – 1:6400-1:25600.

В гипериммунной сыворотке, полученной к ДМ *Y. pseudotuberculosis*, основной антителообразующей активностью обладают белки с видовой псевдотуберкулёзной специфичностью, т.к. эта сыворотка взаимодействовала в ИФА с клетками *Y. pseudotuberculosis* в титрах 1:12800-1:25600, а с клетками других видов иерсиний – всего лишь в титрах 1:100-1:200

Для определения массы наиболее активных в антигенном плане белков полученные

гипериммунные сыворотки крови кроликов были исследованы в иммуноблоттинге (рис. 2).



**Рис. 2. Иммуноблоттинг белков ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis* с родственными сыворотками**

Иммуноблоттинг сыворотки крови, полученной к ДА *Y. pseudotuberculosis*, показал наличие антител к белкам с молекулярными массами 45, 38, 32, 28 кДа, входящими в состав ДА *Y. pseudotuberculosis*. Однако наиболее яркая реакция была отмечена с белком массой 38 кДа (рис. 2).

Сыворотка к ДМ *Y. pseudotuberculosis* наиболее активно взаимодействовала в иммуноблоттинге с

белком молекулярной массы 45 кДа, а также с белками 38, 58, 66 кДа, входящими в состав данного антигена (см. рис. 2).

Таким образом, можно отметить, что неоднородные фракции белков с молекулярными массами 38 и 45 кДа могут в зависимости от способа получения антигена содержать в себе преимущественно родоспецифические или видоспецифические белки.

##### Обсуждение

Температура культивирования псевдотуберкулезного микроба, используемого для получения антигенов (26 °С), и величины молекулярных масс белков, входящих в составы ДА и ДМ, указывают на присутствие в обоих антигенах преимущественно белков-поринов. Антигенные свойства и химическая природа данных белков достаточно хорошо изучены в работах О. Ю. Портнягиной и др. [2]. Однако, получаемые нами белки-порины имели высокую степень

очистки, что повышало стоимость антигенов, производимых на их основе. Проведённые эксперименты с неочищенными фракциями белков-поринов указывают на возможность их использования при производстве диагностических препаратов различной специфичности.

##### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о преобладании в ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis* фракций белков-поринов, которые в зависимости от способа получения антигена могут содержать в себе преимущественно родоспецифические или видоспецифические белки. Отсутствие этапов очистки фракции белков-поринов при производстве ДА и ДМ *Y. pseudotuberculosis* от посторонних белков и ЛПС не снижает значительно специфичности данных антигенов и позволяет их использовать для получения диагностических гипериммунных сывороток.

##### Литература

1. Иерсиниозы / Н. Д. Ющук, Г. Я. Ценева, Г. Н. Кареткина и др. М.: Медицина, 2003. 208 с.
2. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний / О. Ю. Портнягина, О. Д. Новикова, О. П. Вострикова и др. // Вестник ДВО РАН. 2004. № 3. С. 35-44.
3. Relation between serology of meat juice and bacteriology of tonsils and feces for the detection of enteropathogenic *Yersinia spp.* in pigs at slaughter / I. Van Damme, G. Vanantwerpen, D. Berkvens, et al. // Foodborne Pathog. Dis. 2014. Vol. 11. No. 8. P. 596-601.
4. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland / M. Fredriksson-Ahomaa, S. Wacheck, M. Koenig et al. // Int. J. Food Microbiol. 2009. Vol. 135. No. 3. P. 199-202.
5. Свойства диметилсульфоксид-фракции *Yersinia enterocolitica* / А. Хаджу, С. В. Иващенко, Я. В. Древкин и др. // Научная жизнь. 2014. № 6. С. 149-155.
6. Manieson V. E., Ivashchenko S. V. Comparative evaluation of *Yersinia* dimethyl-sulfoxide antigens and antibodies obtained from it // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 421. Article 052028.
7. Иващенко С. В. Применение мембранных белков в диагностике иерсиниозов // Вестник Саратовского государственного университета им. Н. И. Вавилова. 2013. № 2. С. 17-18.
8. Kuznetsova V. S., Ivashchenko S. V. Prospects for the use of disintegrated membranes of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* and specific antibodies derived from them // E3S Web Conf. 2020. Vol. 175. Article 03010
9. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.
10. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. Hamilton, et al. // Analyt. Chem. 1956. Vol. 28, No. 3. P. 350-356.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature. 1970. Vol. 22. P. 680-685.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. Vol. 65, N 1-2. P. 55-63.
13. Hornbeck, P. V. Enzyme-linked immunosorbent assays // Curr. Protoc. Immunol. 2015. Vol. 110. P. 2.1.1-2.1.23.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: journal. 1979. Vol. 76. No. 9. P. 4350-4354.
15. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е. В. Шекунова, М. А. Ковалева, М. Н. Макарова, и др. // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2020. Т. 10. № 1. С. 19-28.

##### References

1. Yersiniosis / N. D. Yushchuk, G. Ya. Tseneva, G. N. Karetkina, et al. Moscow: Medicine, 2003. 208 p.
2. Bacterial porins as promising antigens for diagnostics and vaccination of infectious diseases / O. Yu. Portnyagina, O. D. N. Ovikova, O. P. Vostrikova et al. // Vestnik of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. 2004. No. 3. P. 35-44.

3. Relation between serology of meat juice and bacteriology of tonsils and feces for the detection of enteropathogenic *Yersinia* sP. in pigs at slaughter / I. Van Damme, G. Vanantwerpen, D. Berkvens, et al. // *Foodborne Pathog. Dis.* 2014. Vol. 11.No. 8. R. 596-601.
4. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in wild boars in Switzerland / M. Fredriksson-Ahomaa, S. Wacheck, M. Koenig et al. // *Int. J. Food Microbiol.* 2009. Vol. 135.No. 3. P. 199-202.
5. Properties of the dimethyl sulfoxide fraction of *Yersinia enterocolitica* / A. Hadju, S. V. Ivashchenko, Ya. V. Drevko et al. // *Scientific Life.* 2014. No. 6. P. 149-155.
6. Manieson V. E., Ivashchenko S. V. Comparative evaluation of *Yersinia* dimethyl-sulfoxide antigens and antibodies obtained from it // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* 2020. Vol. 421. Article 052028.
7. Ivashchenko S. V. Application of membrane proteins in the diagnostics of yersiniosis // *Vestnik of Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov.* 2013. No. 2. P. 17-18.
8. Kuznetsova V. S., Ivaschenko S. V. Prospects for the use of disintegrated membranes of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* and specific antibodies derived from them // *E3S Web Conf.* 2020. Vol. 175. Article 03010
9. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248-254.
10. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. Hamilton, et al. // *Analyt. Chem.* 1956. Vol. 28, No. 3. P. 350-356.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 22. R. 680-685.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65, N 1-2. R. 55-63.
13. Hornbeck, P. V. Enzyme-linked immunosorbent assays // *Curr. Protoc. Immunol.* 2015. Vol. 110. R. 2.1.1-2.1.23.
14. Towbin H., taehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: journal.* 1979. Vol. 76. No. 9. P. 4350-4354.
15. Selecting a drug dose for preclinical studies: interspecies dose transfer / E. V. Shekunova, M. A. Kovaleva, M. N. Makarova, et al. // *Vestnik of the scientific center for expertise of medical products.* 2020. Vol. 10. No. 1. P. 19-28.