

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С АНТИГЕНОМ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

С.А. Староверов^{1,2}, А.С. Фомин¹, К.П. Габалов¹, С.В. Иващенко², В.Э. Маниесон²,
Л.А. Дыкман¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия

² Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия

Резюме. *Yersinia enterocolitica*, один из наиболее часто встречающихся возбудителей внутрибольничных инфекций, является причиной иерсиниоза — острого инфекционного заболевания желудочно-кишечного тракта. Проблема кишечного иерсиниоза, вызываемого этой бактерией, весьма актуальна для медицины и ветеринарии; для обнаружения возбудителя в организме человека и животных, а также в продуктах животноводства требуется использование серо- и иммунодиагностики. Одним из самых популярных наноносителей антигенов, используемых для иммунизации и вакцинации, являются наночастицы золота. Преимуществами использования наночастиц золота в качестве «транспортировщиков» вакцин в организме являются их относительно небольшой размер, который позволяет легко проникать в ткани, малая токсичность и длительная циркуляция *in vivo*, низкая стоимость, воспроизводимость. В настоящее время с использованием наночастиц золота ведутся работы по созданию новых диагностических тестов и вакцин против вирусных, бактериальных, паразитарных инфекций, в том числе против бактерий рода *Yersinia*. Цель данного исследования — изучение применения наночастиц золота как иммуномодулятора при иммунизации и вакцинации антигеном, выделенным из *Y. enterocolitica*. Выделенный антиген *Y. enterocolitica* конъюгировали с 15-нанометровыми наночастицами золота. Синтезированный конъюгат был использован для иммунизации лабораторных животных. Методами иммунохимического анализа определены чувствительность и специфичность полученных антител. Для установления протективного эффекта животных вакцинировали конъюгатами антигена и препаратами сравнения. При иммунизации животных конъюгатом наночастиц золота с антигеном *Y. enterocolitica* была получена антисыворотка, специфически распознающая в блот-анализе иерсиниозные белки с молекулярными массами ~35 и ~14 kDa. Обнаружен перекрест с бактериями вида *Y. pseudotuberculosis* и отсутствие перекрестов с клетками бактерий кишечной группы *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, что указывает на родовую специфичность полученных антител. Для определения протективного эффекта животных вакцинировали конъюгатами антигена с наночастицами золота и препаратами сравнения. Через две недели после последней вакцинации мышам внутрибрюшинно вводили культуру патогенного штамма *Y. enterocolitica*. Группы, иммунизированные конъюгатом антигена с наночастицами золота, показали выживаемость 70–80%, тогда как все мыши контрольной группы погибли. Показано, что конъюга-

Адрес для переписки:

Дыкман Лев Абрамович
410049, Россия, г. Саратов, пр. Энтузиастов, 13,
НГИУВ, Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН.
Тел.: 8 (845) 297-04-03.
E-mail: dykman_l@ibppm.ru

Contacts:

Lev A. Dykman
410049, Russian Federation, Saratov, Entuziastov pr., 13,
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants
and Microorganisms, Russian Academy of Sciences.
Phone: +7 (845) 297-04-03.
E-mail: dykman_l@ibppm.ru

Для цитирования:

Староверов С.А., Фомин А.С., Габалов К.П., Иващенко С.В.,
Маниесон В.Э., Дыкман Л.А. Иммуностимулирующее действие
наночастиц золота, конъюгированных с антигеном *Yersinia*
enterocolitica // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 2. С. 377–382.
doi: 10.15789/2220-7619-IEO-1405

Citation:

Staroverov S.A., Fomin A.S., Gabalov K.P., Ivaschenko S.V., Manieson V.E.,
Dykman L.A. Immunostimulating effect of *Yersinia enterocolitica*-antigen
conjugated gold nanoparticles // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 377–382. doi: 10.15789/2220-
7619-IEO-1405

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00077
«Иммуномодулирующий эффект наночастиц золота при вакцинации и иммунотерапии»).

ты иерсиниозного антигена с наночастицами золота обладают более высокой иммуномодулирующей активностью по сравнению с неконъюгированными антигенами. Полученные антитела можно использовать для эффективной иммунодиагностики иерсиниозов. Конъюгаты наночастиц золота с антигенами *Y. enterocolitica* могут послужить основой для создания профилактической вакцины.

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, наночастицы золота, иммунизация, вакцинация, макрофаги, цитокины, иммуноанализ.

IMMUNOSTIMULATING EFFECT OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA*-ANTIGEN CONJUGATED GOLD NANOPARTICLES

Staroverov S.A.^{a,b}, Fomin A.S.^a, Gabalov K.P.^a, Ivaschenko S.V.^b, Manieson V.E.^b, Dykman L.A.^a

^a Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation

^b Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, Russian Federation

Abstract. *Yersinia enterocolitica* is one of the most common causative agents of nosocomial infections and the causative agent of yersiniosis, an acute infectious disease of the gastrointestinal tract. Intestinal yersiniosis caused by *Y. enterocolitica* is a very pressing issue for clinical and veterinary medicine requiring use of sero- and immunodiagnosics to identify the causative agent in humans, animals and animal products. Gold nanoparticles represent one of the most popular antigen nanocarriers used for immunization and vaccination. The advantages of using gold nanoparticles as vaccine delivery vehicles are associated with their relatively small size promoting their tissue penetration, low toxicity and prolonged *in vivo* circulation, low cost, and reproducibility. Currently, the development of new gold nanoparticle-containing diagnostic tests and vaccines against viral, bacterial, parasitic infections, including bacteria of the genus *Yersinia* is underway. The aim of the study was to examine efficacy of 15 nm gold nanoparticles as an immunomodulator coupled to *Y. enterocolitica*-derived antigen for immunization and vaccination. Final conjugate construct was used to immunize laboratory animals. The methods of immunochemical analysis assessed sensitivity and specificity of the antibodies obtained. After that, protective effects were examined in animals vaccinated with antigen conjugates and comparison preparations. It was found that immunization with a *Y. enterocolitica* antigen-gold nanoparticle conjugate resulted in obtaining serum that specifically recognized yersiniosis ~35 and ~14 kDa proteins evaluated in Western blot analysis. It was shown that the specific sera cross-reacted with *Y. pseudotuberculosis* species, but not with intestinal group *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, suggesting the generic specificity of the antibodies obtained. To determine the protective effect, animals were vaccinated with antigen-gold nanoparticle conjugates and comparison preparations. Two weeks after the last vaccination, mice were challenged intraperitoneally with pathogenic strain *Y. enterocolitica* culture. The groups immunized with antigen-gold nanoparticle conjugate had 70–80% survival rate, whereas all control mice died. It was shown that *Yersinia*-derived antigen-gold nanoparticle conjugates possessed higher immunomodulating activity than unconjugated antigen. The antibodies obtained can be used for effective yersiniosis immunodiagnosics. Thus, *Y. enterocolitica* antigen-gold nanoparticle conjugates may serve as a basis for creating preventive vaccines.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, gold nanoparticles, immunization, vaccination, macrophages, cytokines, immunoassay.

Введение

Yersinia enterocolitica является возбудителем кишечного иерсиниоза — острого инфекционного заболевания человека и животных, в основном передающегося фекально-оральным путем. Эта бактерия входит в число наиболее часто встречающихся возбудителей внутрибольничных инфекций, поскольку в большинстве случаев передача инфекции происходит от человека к человеку через продукты питания и руки медицинских работников [9]. В развитых странах, в том числе и в России, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* являются одними из основных энтеропатогенных бактерий — возбудителей кишечных инфекций. Проблема кишечного иерсиниоза, вызываемого *Y. enterocolitica*, весьма актуальна для медицины и ветеринарии; для выявления возбудителя

в организме человека и животных и продуктах животноводства требуется использование серо- и иммунодиагностики [3]. Невысокая эффективность бактериологических методов исследования (~30%) в связи с длительностью анализа (1–2 недели) и органотропностью иерсиний повышает значимость иммуноаналитических методов диагностики.

У патогенных для человека штаммов *Y. enterocolitica*, обнаружена плаزمиды, имеющая размер ~70 тыс. п.о., кодирующая ряд факторов вирулентности. Некоторые из этих факторов могут выделяться в питательную среду при дефиците кальция. К таким факторам относят, в частности, секретируемые белки LcrV и белки наружной мембраны Yop, специфичные для иерсиний. Кроме того, для иммунодиагностики используют антитела, полученные на липополисахаридах. Реже получают антитела на антигенах (АГ)

клеточной стенки, пептидогликан, капсульные полисахариды, белки теплового шока [4]. Специфическая вакцинопрофилактика кишечного иерсиниоза до сих пор не разработана.

Препараты диагностических коммерческих иерсиниозных антител далеко не всегда эффективны, и их выбор невелик. Поэтому поиск новых диагностически значимых АГ иерсиний, получение к ним антисывороток и разработка на их основе эффективных, недорогих и надежных экспресс-тестов представляются весьма актуальными.

Одними из самых популярных наноносителей АГ, применяемых для иммунизации и вакцинации, являются наночастицы золота (НЧЗ). Опубликовано большое количество работ, в которых НЧЗ были использованы для получения антител к целому ряду гаптенных и полноценных АГ [8]. Были обнаружены адъювантные свойства, присущие самим НЧЗ [1]. В настоящее время с использованием НЧЗ ведутся работы по созданию новых диагностических тестов и вакцин против вирусных, бактериальных, паразитарных инфекций, в том числе против бактерий рода *Yersinia*: *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* [5, 10].

Цель нашего исследования — изучение возможности применения НЧЗ как иммуномодулятора при иммунизации и вакцинации АГ, выделенными из *Y. enterocolitica*.

Материалы и методы

В исследовании был использован штамм *Y. enterocolitica* 66-82 сероварианта O:3 из государственной коллекции патогенных микроорганизмов РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Для освобождения от свободных липидов бактериальные клетки обрабатывали ацетоном. Для разрушения клеточных стенок обработанные ацетоном микробные клетки инкубировали в шестикратном объеме диметилсульфоксида при 37°C в течение 40 мин, затем отделяли их центрифугированием (5000g, 20 мин, +4°C) и диализовали против 0,01 М карбонатно-бикарбонатного буфера (pH 9,6) в течение 2 суток с пятикратной сменой буфера [6]. После проведения диализа АГ концентрировали с помощью фильтрационной установки Amicon и мембран PLGC (Merck Millipore, Германия), разливали на аликвоты по 300 мкл и лиофильно высушивали.

В экспериментах по иммунизации животных конъюгатами АГ использовали 15-нанометровые НЧЗ, которые получали по методу Боровской–Туркевича–Френса [2]. Восстановление золотохлористоводородной кислоты (HAuCl₄) проводили в колбе Эрленмейера на магнитной мешалке с обратным водяным

холодильником при нагревании 242,5 мл 0,01%-ного водного раствора HAuCl₄ (Sigma-Aldrich, США). После закипания вносили 7,5 мл 1%-ного водного раствора натрия цитрата (Fluka, Швейцария). Средний размер частиц определяли с использованием спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии и фотонной корреляционной спектроскопии. Перед конъюгацией иерсиниозного АГ с НЧЗ определяли «золотое число» — количество миллиграммов АГ, которое достаточно, чтобы предотвратить агрегацию частиц, определяемую по изменению цвета 10 мл красного золя золота на голубой при добавлении 1 мл 10%-ного раствора NaCl. Минимальная стабилизирующая концентрация для выделенного иерсиниозного АГ составила 25 мкг/мл.

Полученный конъюгат был использован для иммунизации лабораторных мышей. Иммунизацию осуществляли 6 группам животных (по 6 голов в каждой группе). Препараты вводили внутрибрюшинно двукратно с интервалом в 10 дней, в дозе по белку 25 мкг на животное, эвтаназию проводили через 10 дней после последней инъекции. 1-й группе вводили раствор АГ; 2-й группе — конъюгат АГ с НЧЗ; 3-й группе — раствор АГ, эмульгированный 1:1 в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ); 4-й группе — конъюгат АГ с НЧЗ, эмульгированный 1:1 в ПАФ; 5-й группе — раствор НЧЗ; 6-й группе (контроль) — фосфатно-солевой буфер (ФСБ).

После завершения иммунизации собирали сыворотку для определения титра и концентрации интерлейкинов, а также проводили выделение макрофагов брюшной полости и спленоцитов для исследования дыхательной и пролиферативной активности [12]. Определение дыхательной активности проводили с использованием МТТ-теста, основанного на восстановлении клетками красителя нитротетразолевого синего в нерастворимый формазан [7]. Для определения титра антител в сыворотке крови применяли иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием антител к IgG мышей, меченных пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, Великобритания).

Образцы АГ разделяли электрофорезом в 5–15%-ном градиентном полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях при постоянном токе 30 мА/см², используя трис-глициновый буфер (pH 8,3) [11]. После проведения электрофореза образцы белка переносили полусухим методом на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану Western S (Millipore, США) и инкубировали в течение 1 ч в блокирующем буфере, содержащем 0,1% Твин-20 и 5% обезжиренного молока. Затем мембрану в течение 1 ч инкубировали в полученной поликлональной антисыворотке в разведении 1:200. После чего мем-

брану промывали и окрашивали вестерн-блот с применением конъюгата стафилококкового белка А с НЧЗ.

Дот-иммуноанализ проводили по следующей методике: на PVDF-мембрану наносили отмытые от среды клетки бактерий в двойных разведениях (начальная концентрация 10^9 кл/мл). Мембрану с нанесенными на нее АГ блокировали 2%-ным сухим молоком в 0,01 М ФСБ в течение 1 ч. После чего мембрану инкубировали в растворе антисыворотки, разведенной в 100 раз в 0,01 М ФСБ, рН 7,2, при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем мембрану отмывали от неспецифически связавшихся антител и инкубировали в растворе конъюгата стафилококкового белка А с НЧЗ ($A_{520} = 1,0$). Результат реакции визуально наблюдали через 5–10 мин в виде красных пятен. Кроме того, специфичность полученных сывороток по отношению к клеткам бактерий кишечной группы определяли методом ИФА.

Для выявления протективного эффекта животных предварительно вакцинировали конъюгатами АГ и препаратами сравнения. Вакцинацию осуществляли 6 группам животных (по 10 голов в каждой группе). Вакцинацию проводили трехкратно с интервалом в 2 недели. Препараты вводили белым мышам внутрибрюшинно в дозе 6,25 мкг. 1-й группе вводили раствор АГ; 2-й группе — конъюгат АГ с НЧЗ; 3-й группе — раствор АГ, эмульгированный 1:1 в ПАФ; 4-й группе — конъюгат АГ с НЧЗ, эмульгированный 1:1 в ПАФ; 5-й группе — раствор НЧЗ; 6-й группе (контроль) — ФСБ. Через две

недели после последней вакцинации мышам внутрибрюшинно вводили 3-суточную культуру *Y. enterocolitica* 66-82 сероварианта О:3; заражающая доза — 5×10^9 кл/мышь.

При работе с животными руководствовались «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Результаты были статистически обработаны с использованием t-критерия Стьюдента для определения достоверности различий между выборками в экспериментальных и контрольных исследованиях. После того, как было найдено среднее арифметическое и стандартное отклонение для выборки данных, определили стандартную ошибку среднего арифметического и ее доверительные пределы по t-коэффициенту Стьюдента (n, p) на уровне значимости 95% ($p = 0,05$).

Результаты и обсуждение

Титры антисывороток, полученных при иммунизации мышей по различным схемам АГ, выделенным из *Y. enterocolitica*, представлены в таблице. Наиболее высоким оказался титр у мышей, иммунизированных конъюгатом АГ с НЧЗ, эмульгированным в ПАФ.

Дыхательная активность перитонеальных макрофагов мышей повышалась при иммунизации АГ+ПАФ на 34%, АГ+НЧЗ на 64%, АГ+НЧЗ+ПАФ на 100% по сравнению с показателем контрольной группы (ФСБ). Пролиферативная активность мононуклеарных клеток мышей повышалась при иммунизации АГ+НЧЗ в 1,7 раза, АГ+ПАФ — в 2,2 раза, АГ+НЧЗ+ПАФ — в 3,9 раза по сравнению с контролем. Также был определен уровень выработки цитокинов при иммунизации мышей иерсиниозным АГ по различным схемам. При сравнении уровня выработки интерферона у мышей контрольной и опытных групп мы установили, что уровень интерферона в группе, иммунизированной АГ+НЧЗ, был выше, чем в контрольной группе, в 1,8 раза, АГ+ПАФ — в 2,3 раза, АГ+НЧЗ+ПАФ — в 2,7 раза. Введение АГ без адьювантов не вызывало значимого изменения уровня интерферона. Уровень IL-1 в группе, иммунизированной АГ+НЧЗ, был выше, чем в контрольной группе, в 2,2 раза, АГ+ПАФ — в 1,8 раза, АГ+НЧЗ+ПАФ — в 4 раза. Уровень IL-6 в группе, иммунизированной АГ+НЧЗ, был выше, чем в контрольной группе, в 2 раза, в группе АГ+ПАФ — в 2,7 раза и в группе АГ+НЧЗ+ПАФ — в 2,9 раза.

Была исследована специфичность полученных сывороток в ИФА с клетками бактерий кишечной группы в начальной концентрации 10^9 клеток/мл. Все антисыворотки показали

Таблица. Титр антисывороток, полученных при иммунизации мышей по различным схемам АГ, выделенным из *Y. enterocolitica*

Table. Antisera titer obtained after mouse depending on various protocols of *Y. enterocolitica* antigen isolation

Иммуноген Immunogen	Средний титр Mean titer	Максимальный титр Maximum titer
АГ+НЧЗ Ag ¹ +GNPs ²	1:1664	1:2560
АГ+НЧЗ+ПАФ Ag+GNPs+CFA ³	1:13 312	1:20 480
АГ Ag	1:896	1:1280
АГ+ПАФ Ag+CFA	1:3328	1:5120
НЧЗ GNPs	0	0
ФСБ PBS ⁴	0	0

Примечание. ¹ — антиген; ² — наночастицы золота; ³ — полный адьювант Фрейнда; ⁴ — фосфатно-солевой буфер.

Note. ¹ — antigen; ² — gold nanoparticles; ³ — complete Freund's adjuvant; ⁴ — phosphate buffer saline.

перекрест с бактериями вида *Y. pseudotuberculosis* и отсутствие перекрестов с клетками *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, что указывает на родовую специфичность полученных антител. Аналогичные результаты были получены при проведении дот-иммуноанализа (рис.).

Лизат целых бактериальных клеток и АГ, выделенный из *Y. enterocolitica*, фракционировали электрофоретически. После полусухого переноса окрашивали вестерн-блот с использованием поликлональной сыворотки, полученной от мышей, иммунизированных конъюгатом АГ с НЧЗ, эмульгированном в ПАФ. Выявление реакции проводили с применением конъюгата белка А с НЧЗ. Полученная сыворотка специфически распознавала белки с молекулярной массой ~35 и ~14 kDa.

Для определения протективного эффекта животных предварительно вакцинировали конъюгатами иерсиниезного АГ с НЧЗ и препаратами сравнения. Установлено, что все мыши контрольной группы, иммунизированные ФСБ, погибли. Группа, иммунизированная НЧЗ, сократилась на 70%, группы, иммунизированные АГ и АГ+ПАФ, — на 40%. Самый высокий протективный ответ показали группы, иммунизированные АГ+НЧЗ+ПАФ, — 80% выживших животных и АГ+НЧЗ — 70%. Кроме того, отметим, что в процессе иммунизации наблюдалось отсутствие соединительнотканых уплотнений подкожной клетчатки в местах введения АГ+НЧЗ и наличие данных образований при использовании ПАФ.

Таким образом, конъюгаты НЧЗ с иерсиниезным АГ проявили более высокую иммуностимулирующую активность, чем нативный АГ. По-видимому, адъювантное действие конъюгата обусловлено активацией фагоцитирующих клеток и, соответственно, улучшением представления АГ антителообразующим клеткам. На наш взгляд, полученные антитела можно использовать для эффективной иммунодиагностики иерсиниозов. Кроме того, конъюгаты

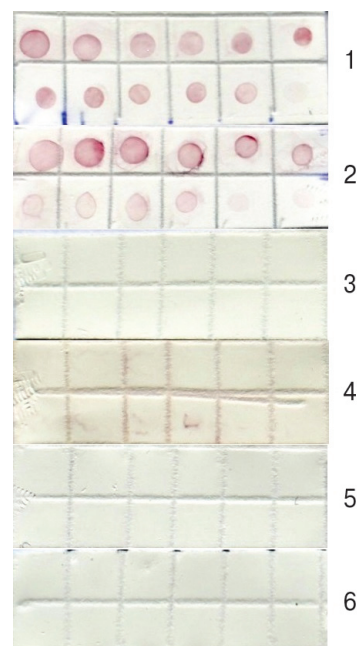


Рисунок. Дот-иммуноанализ бактериальных клеток *Y. enterocolitica* (1), *Y. pseudotuberculosis* (2), *Salmonella enterica* (3), *Escherichia coli* (4), *Proteus vulgaris* (5), *Pseudomonas aeruginosa* (6)

Figure. Dot immunoassay of bacterial cells of *Y. enterocolitica* (1), *Y. pseudotuberculosis* (2), *Salmonella enterica* (3), *Escherichia coli* (4), *Proteus vulgaris* (5), *Pseudomonas aeruginosa* (6)

НЧЗ с АГ *Y. enterocolitica* могут послужить основой для создания профилактической вакцины.

Отметим преимущества использования НЧЗ в качестве «транспортных» вакцин: их относительно небольшой размер, который позволяет легко проникать в ткани, малая токсичность и длительная циркуляция *in vivo*, низкая стоимость, воспроизводимость. НЧЗ могут защитить вакцины от преждевременной деградации, улучшить стабильность, обладают хорошими адъювантными свойствами, а также способствуют целевой доставке иммуногена антиген-презентирующим клеткам.

Список литературы/References

1. Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Шеголев С.Ю. Адъювантные свойства наночастиц золота // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5, № 11–12. С. 58–68. [Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Adjuvant properties of gold nanoparticles. *Rossiiskie nanotekhnologii = Nanotechnologies in Russia*, 2010, vol. 5, no. 11–12, pp. 748–761.] doi: 10.1134/S1995078010110029
2. Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Методы химического синтеза коллоидного золота // Успехи химии. 2019. Т. 88, № 3. С. 229–247. [Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Methods for chemical synthesis of colloidal gold. *Uspekhi khimii = Russian Chemical Reviews*, 2019, vol. 88, no. 3, pp. 229–247.] doi: 10.1070/RCR4843
3. Ленченко Е.М., Куликовский А.В., Павлова И.Б. Иерсиниоз. Этиология, эпизоотология, диагностика, меры борьбы и профилактики. М.: МГУПБ, 1998. 124 с. [Lenchenko E.M., Kulikovskij A.V., Pavlova I.B. Yersiniosis. Etiology, epizootology, diagnostics, measures of counteraction and prophylaxis. *Moscow: Moscow State University of Applied Biotechnologies*, 1998. 124 p. (In Russ.)]
4. Маслова И.И., Хоробрых Н.Е., Ушакова М.А., Овечко Н.Н., Муравьев Ю.В. Антитела к *Yersinia enterocolitica* и *Proteus mirabilis* в сыворотках больных ревматоидным артритом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.

2004. № 4. С. 71–72. [Maslova I.I., Khorobrykh N.E., Ushakova M.A., Ovechko N.N., Murav'ev Iu.V. Antibodies to *Yersinia enterocolitica* and *Proteus mirabilis* in blood sera of rheumatoid arthritis patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2004, no. 4, pp. 71–72. (In Russ.)]
5. Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щербakov А.А., Семенов С.В., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А. Получение антител к антигенам *Yersinia pseudotuberculosis* с использованием в качестве адъюванта частиц коллоидного золота // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 3. С. 54–57. [Staroverov S.A., Ermilov D.N., Shcherbakov A.A., Semenov S.V., Shchyegolev S.Yu., Dykman L.A. Generation of antibodies to *Yersinia pseudotuberculosis* antigens using the colloid gold particles as an adjuvant. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2003, no. 3, pp. 54–57. (In Russ.)]
 6. Хаджу А., Иващенко С.В., Фомин А.С., Щербakov А.А., Староверов С.А., Дыкман Л.А. Использование гипериммунной сыворотки, полученной к ДМСО-антигену кишечной эшерихиозного микроба, в непрямом dot-иммуноанализе с конъюгатом коллоидного золота // Научное обозрение. 2015. № 5. С. 30–34. [Khadzhu A., Ivaschenko S.V., Fomin A.S., Scherbakov A.A., Staroverov S.A., Dykman L.A. Usage of hyperimmune serum obtained for the DMSO-antigen of intestinal yersiniosis microbe in the indirect dot-immunoanalysis with colloidal gold conjugate. *Nauchnoe obozrenie = Scientific Review*, 2015, no. 5, pp. 30–34. (In Russ.)]
 7. Bernas T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, vol. 380, no. 1, pp. 108–116. doi: 10.1006/abbi.2000.1907
 8. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem. Sci.*, 2017, vol. 8, no. 3, pp. 1719–1735. doi: 10.1039/C6SC03631G
 9. Fàbrega A., Vila J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2012, vol. 30, no. 1, pp. 24–32. doi: 10.1016/j.eimc.2011.07.017
 10. Gregory A.E., Williamson E.D., Prior J.L., Butcher W.A., Thompson I.J., Shaw A.M., Titball R.W. Conjugation of *Y. pestis* F1-antigen to gold nanoparticles improves immunogenicity. *Vaccine*, 2012, vol. 30, no. 48, pp. 6777–6782. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.09.021
 11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0
 12. Leiter E.H. The NOD mouse: a model for insulin dependent diabetes mellitus. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2001, vol. 24, no. 1, pp. 15.9.1–15.9.23. doi: 10.1002/0471142735.im1509s24

Авторы:

Староверов С.А., д.б.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия; профессор Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия;
Фомин А.С., к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия;
Габалов К.П., научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия;
Иващенко С.В., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия;
Маниесон В.Э., аспирант кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия;
Дыкман Л.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, руководитель группы иммунотехнологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия.

Authors:

Staroverov S.A., PhD, MD (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation; Professor, Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, Russian Federation;
Fomin A.S., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation;
Gabalov K.P., Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation;
Ivaschenko S.V., PhD, Associate Professor, Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry, Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, Russian Federation;
Manieson V.E., PhD Student, Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry, Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, Russian Federation;
Dykman L.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Head of Immunotechnology Group, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.03.2020
 Принята к печати 17.05.2020

Received 10.03.2020
 Accepted 17.05.2020