

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-51

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ
С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ НА ОСНОВЕ СТИМУЛЯЦИИ
И ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА ***

**DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR THE DIAGNOSIS OF HEMORRHAGIC FEVER
WITH RENAL SYNDROME BASED ON STIMULATION AND ASSESSMENT OF CHANGES
IN THE PRODUCTION OF INTERFERON GAMMA**

Н. Ю. Андреева¹, Е. В. Мартынова¹, Ю. Н. Давидюк¹, М. Алсаади¹,
В. Г. Шакирова², С. Ф. Хайбуллина¹, А. А. Ризванов¹, Э. Кабве¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет

²Казанская государственная медицинская академия

N. Y. Andreeva¹, E. V. Martynova¹, Y. N. Davidyuk¹, M. Alsaadi¹,
V. G. Shakirova², S. F. Khaibullina¹, A. A. Rizvanov¹, E. Kabwe¹

¹Kazan Federal University

²Kazan State Medical Academy

✉ natasha_andreeva_2000@mail.ru

Аннотация

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) остается значимой проблемой в эндемичных регионах РФ. В ряде случаев антитела не обнаруживаются, что затрудняет диагностику. Мы разработали подход к выявлению Т-клеточного ответа при ГЛПС, основанный на стимуляции РВМС рекомбинантным N-белком PUUV с последующей оценкой продукции интерферона-γ. Показана специфическая активация иммунных клеток больных ГЛПС и оптимизированы параметры тест-системы.

Abstract

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) remains a significant public health concern in endemic regions of Russia. In certain cases, specific antibodies are not detected, complicating diagnosis. We developed a test system to assess T-cell responses via stimulation of PBMCs with recombinant PUUV N protein and measurement of IFN-γ. Specific immune activation was confirmed in HFRS patients, and assay conditions were optimized.

Введение

Ортоксантавирусы являются зоонозными патогенами, вызывающими геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС), характеризующуюся лихорадкой, тромбоцитопенией и нарушением функции почек. В РФ основным возбудителем ГЛПС является *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV). Несмотря на высокую эпидемиологическую значимость, одобренная вакцина против ГЛПС в РФ на сегодняшний день отсутствует, а возможности ранней и надежной диагностики остаются ограниченными [1].

Геном ортоксантавирусов состоит из трех сегментов одноцепочечной РНК отрицательной полярности — S, M и L. Сегмент S кодирует нуклеокапсидный белок (N), который является мощным иммуногеном и основным диагностическим антигеном [2]. Целью данного исследования является разработка прототипа IGRA-подобной диагностической тест-системы для оценки клеточного иммунного ответа при ГЛПС, основанной на стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) рекомбинантным N-белком PUUV, и последующего анализа уровня продукции интерферона-γ (IFN-γ).

Материалы и методы

S-сегмент PUUV, кодирующий N-белок, клонировали в плазмидный вектор pET-28a(+). ORF экспрессировали в *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, N-белок очищали с использованием аффинной хроматографии [3]. Очищенный N-белок использовали для стимуляции РВМС. РВМС выделяли из цельной крови пациентов с ГЛПС и у здоровых доноров, следуя стандартному протоколу выделения в градиенте плотности фиколла. Проводили

* Исследование является частью Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

© Н. Ю. Андреева, Е. В. Мартынова, Ю. Н. Давидюк, М. Алсаади, В. Г. Шакирова, С. Ф. Хайбуллина, А. А. Ризванов, Э. Кабве, 2025

титрование числа клеток и концентрации антигена. Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 24 часов с рекомбинантным N-белком PUUV в конечных концентрациях от 0,1 до 5 мкг/мл. Определение IFN-γ в культуральной жидкости проводили методом ИФА с использованием коммерческого набора, согласно инструкции производителя.

Результаты

Был экспрессирован и очищен рекомбинантный N-белок PUUV, проявляющий иммуногенные свойства *in vitro* и *in vivo* [3]. В рамках работы выполнено титрование количества PBMC, выделенных из образцов крови пациентов с подтвержденной ГЛПС ($n = 10$) и здоровых доноров ($n = 10$), в диапазоне от 50 тыс. до 300 тыс. клеток на лунку. Клетки стимулировались рекомбинантным N-белком PUUV в концентрациях от 0,1 до 5 мкг. Количественное определение продукции IFN-γ проводилось методом ИФА (рис. 1).

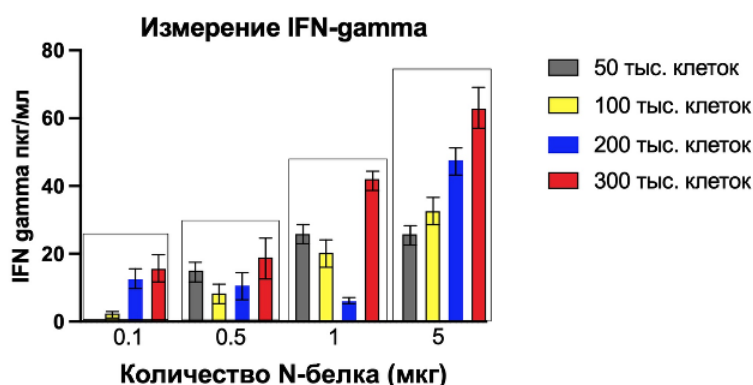


Рис. 1. Титрование PBMC и N-белка для выявления оптимальных условий стимуляции клеточного иммунного ответа

Установлено, что оптимальные параметры стимуляции для разработки диагностической тест-системы составляют 300 тыс. клеток на лунку и 5 мкг N-белка. При данных условиях в группе пациентов с ГЛПС наблюдалась достоверно более высокая продукция IFN-γ по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0,05$). В качестве отрицательных контролей использовались PBMC без антигена и PBMC, инкубированные с бычьим сывороточным альбумином (BSA). В качестве положительного контроля применялся митоген — фитогемагглютинин (PHA) (рис. 2).

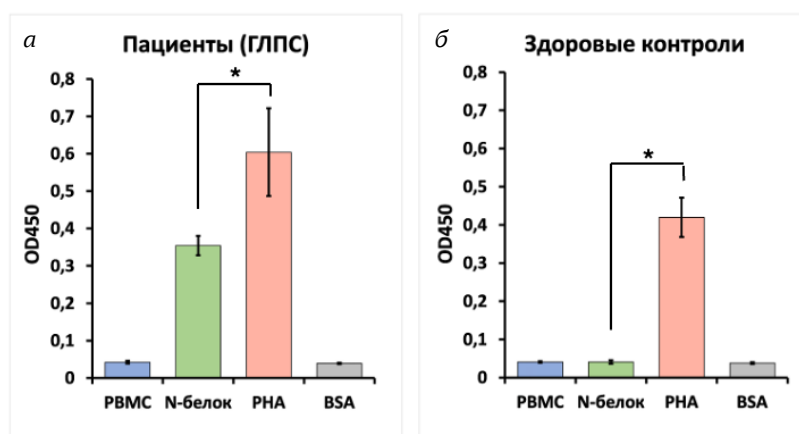


Рис. 2. Продукция IFN-γ клетками PBMC в ответ на стимуляцию N-белком у больных ГЛПС (а) ($n = 10$) и здоровых доноров (б) ($n = 10$); PHA — фитогемагглютинин; BSA — бычий сывороточный альбумин

Полученные данные подтверждают способность рекомбинантного N-белка PUUV индуцировать специфический Т-клеточный ответ у переболевших ГЛПС пациентов. Оптимизированные параметры стимуляции могут быть использованы в качестве основы для разработки IGRA-подобного диагностического теста, направленного на выявление клеточного иммунитета к PUUV.

Выводы

Разработан протокол для оценки продукции IFN- γ клетками PBMC при стимуляции рекомбинантным N-белком PUUV. Показано, что PBMC пациентов, перенесших ГЛПС, продуцируют достоверно более высокие уровни IFN- γ в ответ на антигенную стимуляцию по сравнению с PBMC здоровых доноров. Оптимизированы параметры постановки теста, включая количество клеток (300 тыс. на лунку), концентрацию антигена (5 мкг на лунку) и условия инкубации (24 ч, 37 °C). Полученные результаты подтверждают возможность применения данного подхода в качестве основы для разработки IGRA-подобной диагностической тест-системы, направленной на выявление специфического Т-клеточного ответа к PUUV.

Литература

1. Sehgal A., Mehta S., Sahay K. et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Asia: history, pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention // *Viruses*. 2023. Vol. 15. P. 561.
2. Jiang H., Zheng X., Wang L. et al. Hantavirus infection: A global zoonotic challenge // *Virol. Sin.* 2017. Vol. 32. P. 32–43.
3. Andreeva N., Martynova E., Elboeva P. et al. Recovering immunogenic orthohantavirus Puumalaense N protein from pellets of recombinant *Escherichia coli* // *Vaccines*. 2025. Vol. 13. P. 744.