

**ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС –
ПОКАЗАТЕЛЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ № _____

МОСКВА 2021

УДК 616-093

ББК 52.76

С

Организация-разработчик:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова»

Составители:

Т.П.Оспельникова, кандидат медицинских наук; **Л.В.Колодяжная**; **В.Ю.Табakov**, кандидат биологических наук; **Ф.И.Ершов**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Рецензенты:

Г.Л.Осипова – доктор медицинских наук, врач аллерголог- иммунолог, пульмонолог, зав. отделом клинических исследований ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, профессор образовательного центра

И.А.Ленёва– доктор биологических наук, зав. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова

Предназначение: настоящие методические рекомендации представляют собой изложение техники постановки определения интерферонового (ИФН) статуса в норме и при патологии; выявление тяжести заболевания; подбор иммуноактивных препаратов для профилактики, лечения и оценки эффективности терапии этими препаратами.

Для врачей-лаборантов, клинических иммунологов, аллергологов, инфекционистов и вирусологов.

Данный документ является собственностью Федерации лабораторной медицины и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующих разрешений

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОПИСАНИЕ МЕТОДА.....	6
Материально-техническое обеспечение.....	6
Анализируемые образцы.....	7
Подготовка реагентов	7
Проведение исследования ИФН статуса	8
Определение коэффициента стимуляции (КСт) выработки биологически активного ИФН иммуноактивными препаратами.. ..	9
Расчет результатов.....	12
Экономическое преимущество метода.....	13
Контроль качества	13
ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	14
ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	14
Возможные осложнения при использовании методических рекомендаций и способы их устранения.....	14
КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СТАТУСА	15
Интерпретация результатов.....	15
Критерии интерпретации результатов.....	15
Клиническая информативность лабораторных исследований ИФН статуса	16
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	17
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	18

Список сокращений

ИАП – иммуноактивные препараты

ИФН – интерферон

ИФН статус – интерфероновый статус

КСт - коэффициент стимуляции выработки ИФН иммуноактивными препаратами

ПС – поддерживающая среда

РС – ростовая среда

ТБА – титр биологической активности: показатель уровня выработки биологически активного ИФН

ФГА – фитогемагглютинин

ЦПД – цитопатическое действие тест-вируса

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЕМС – тест-вирус энцефаломиокардита мышей

NDV – вирус болезни Ньюкасла

Vero – культура эпителиальных клеток почки обезьяны

Vero-SF - адаптированная бессывороточная линия клеток Vero

VSV – тест-вирус везикулярного стоматита

ВВЕДЕНИЕ

Спустя 64 года после открытия интерферонов (ИФН) [18] накоплена обширная информация об их физико-химических и биологических свойствах, по сути, создано учение о системе ИФН. Синтез эндогенного ИФН является одной из первых реакций врожденного иммунитета в ответ на проникновение вирусов, бактерий и т.д.

В настоящее время, когда весь мир столкнулся с распространением нового коронавируса SARS-CoV-2, актуальным стало определение противовирусного иммунитета с помощью метода ИФН статуса. Наши последние данные по оценке противовирусного состояния у больных с COVID-19, даже бессимптомным его течением, показали сильное снижение (угнетение) продукции ИФН I типа, с которыми не встречались ранее при изучении других респираторных вирусных инфекций.

Метод, предложенный нами, дает возможность определить тяжесть заболевания, возможность коррекции препаратами индукторов ИФН, иммуномодуляторами и др. иммуноактивными препаратами, оценить эффективность терапии в динамике лечения.

Настоящие методические рекомендации представляют собой изложение алгоритмов исследования и интерпретации интегрального критерия функционального состояния системы интерферонов - интерферонового статуса (ИФН статуса). Результаты исследования ИФН статуса с определением стимуляции выработки биологически активного ИФН иммуноактивными препаратами могут быть использованы в специализированных лечебных заведениях с целью повышения эффективности лечения иммуноактивными препаратами интерферонов, их индукторов, иммуномодуляторов, вакцин.

В понятие ИФН статус входит определение *in vitro* функциональной биологически активной продукции ИФН, продуцируемых стимулированными лейкоцитами крови, и определение уровня ИФН в сыворотке крови. На основании полученных результатов показано, что состояния с полным или частичным «выпадением» различных звеньев системы ИФН- α/β - или γ -ИФН являются причиной или следствием острых и хронически рецидивирующих вирусных инфекций [2, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13], с прослеживанием взаимосвязи между показателями **ИФН статуса** и тяжестью заболевания.

Исторически методика определения биологически активного ИФН преодолела несколько усовершенствованных этапов от постановки «макрометодом» [12, 16] к «микрометоду», от выделенных лимфоцитов к лейкоцитам цельной крови [12, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23], от дорогостоящей диплоидной клеточной культуры фибробластов эмбриона человека с ограниченным рабочим потенциалом к культуре клеток почки зеленой мартышки, сохраняющей чувствительность к ИФН при длительном количестве пассажей.

В результате многочисленных повторов метода ИФН статуса на разных культурах клеток выявлено, что показатели биологически активной продукции ИФН I (α/β) и II (γ) типов были одинаковыми как на культуре клеток фибробластов эмбриона человека, так и на культуре клеток Vero, культивируемых на сывороточных и бессывороточных питательных средах. Преимущество использования клеточной культуры Vero-SF, адаптированной к бессывороточной питательной среде, состоит в том, что дает возможность оптимизировать и стандартизировать метод для использования в массовых лабораторных исследованиях [10].

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Метод «ИФН статус» включает определение в крови пациентов уровней индуцированной биологически активной продукции ИФН I, II типов и циркулирующего (сывороточного) ИФН, которые оцениваются на чувствительных к ИФН культурах клеток с тест-вирусом [1].

Материально-техническое обеспечение

Для осуществления метода ИФН статуса используется следующее оборудование и расходные материалы (с возможной заменой на аналогичное оборудование и реагенты):

Оборудование и лабораторная посуда/пластик:

- CO₂-инкубатор SaNyо;
- Холодильник Atlant 5013-016;
- Центрифуга лабораторная BioSan с центробежным ускорением 1000-1500g;
- Инвертированный микроскоп Nikon E200F;
- Ламинарный шкаф II класса с вертикальной подачей стерильного воздуха БМБ-II-«Ламинар-С.»-1.2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- Пробирки стерильные с литий-гепарином;
- Планшеты стерильные кругло- и плоскодонные 96-луночные SPL Life Sciences;
- Чашки Петри стерильные SPL Life Sciences;
- Пробирки центрифужная, полипропиленовые, на 15 мл, стерильные;
- Серологические пипетки на 5 и 10 мл, стерильные;
- Автоматические пипетки Biohit или Sartorius с переменным объемом на 20-200, 1000 мкл;
- Наконечники к автоматическим пипеткам Biohit или Sartorius.

Реагенты и материалы:

- Среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия);
- Среда DMEM/F12 с глутамином;
- Эмбриональная телячья сыворотка (Life Techn., Netherlands и т.п.);
- Бессывороточная среда (ГибриС-1-II (ПанЭко, Россия); и т.п.);
- Ростовая добавка BioVer;
- Гентамицин 10 мг/мл;
- Фитогемагглютинин Р (ФГА) 10 мг/мл (ПанЭко, Россия);
- Вирус болезни Ньюкасла (NDV), штамм Канзас, с активностью используемого вируса не менее 10⁸ ЦПД₅₀ в 1 мл аллантоисной жидкости;
- Вирус везикулярного стоматита с активностью не менее 10⁵ ТЦД/мл (VSV, штамм Индиана);
- Вирус энцефаломиокардита мышей с активностью не менее 10⁵ ТЦД/мл (EMC);
- Клетки почки зелёной мартышки Vero; клетки Vero-SF, культивируемые на бессывороточной среде;
- Препараты индукторов интерферонов, препараты иммуномодуляторы, др. иммуноактивные препараты.

Анализируемые образцы

Биоматериалом для исследования является гепаринизированная кровь. Цельную кровь в объеме от 4 мл (для детей - от 1 мл) набирают в соответствующие пробирки с литий-гепарином для дальнейшего проведения реакции ИФН статуса и определения коэффициента стимуляции выработки биологически активного ИФН иммуноактивными препаратами.

Подготовка реагентов

1. Подготовка рабочих растворов питательных сред:
 - а) Подготовка рабочих растворов питательных сред RPMI-1640, DMEM/F12: к 450 мл каждой среды добавляют 4 мл антибиотика гентамицина.
 - б) Для клеток Vero готовят ростовую среду (РС), добавляя в DMEM/F12 10 % ЭТС.
 - в) При титровании ИФН на этих же клетках готовят поддерживающую среду (ПС), добавляя в DMEM/F12 2 % ЭТС.
 - г) Для клеток Vero-SF используют готовую питательную среду ГибриС-1-П или готовят среду DMEM/F12 с добавлением ростовой добавки ViolVer.
2. Подготовка рабочего раствора вируса NDV: вирус разводят в 10 раз рабочим раствором питательной среды RPMI-1640.
3. Подготовка рабочего раствора ФГА: сухой порошок ФГА разводят в 10 мл стерильной воды для инъекций, далее разводят в 10 раз рабочим раствором питательной среды RPMI-1640.
4. Подготовка рабочего раствора препаратов: используемые иммуноактивные препараты разводят рабочим раствором питательной среды RPMI-1640, согласно перерасчету терапевтической дозировки препарата для 20 мкл крови.

Проведение исследования ИФН статуса

Исследование ИФН статуса должно проводиться в лабораторных условиях с использованием бокса биологической безопасности II класса.

Этапы определения биологически активной продукции интерферонов

1) Постановка реакции

1. Реакцию проводят с использованием стерильных 96-луночных круглодонных планшетов, в лунки которых вносят по 160 мкл рабочей среды RPMI-1640.
2. Для продукции ИФН I типа к 160 мкл среды RPMI-1640 в лунку вносят 20 мкл NDV.
3. Для продукции ИФН II типа к 160 мкл среды RPMI-1640 в лунку вносят 20 мкл ФГА.
4. Затем во все лунки добавляют по 20 мкл цельной гепаринизированной крови и хорошо перемешивают содержимое каждой лунки пипетированием.
5. Планшеты закрывают крышками и инкубируют в CO₂-инкубаторе при 37°C 24-48 ч.
6. После инкубации отбирают супернатанты в стерильные круглодонные планшеты и хранят в холодильнике при температуре от 2 до 8 градусов С (+4 °С) до титрования.
7. После выполнения пп.1-4 оставшаяся кровь хранится в холодильнике при температуре (2-8)° С; затем из отстоявшейся или отцентрифугированной при 1000 об/мин в течение 5 мин. крови берут стерильно 100 мкл сыворотки/плазмы крови для титрования.

На круглодонном планшете для постановки реакции можно разместить пробы от нескольких пациентов, в зависимости от того, определяется ли для пациентов подбор препаратов и от количества заявленных препаратов.

В качестве примера приведена **таблица 1**, в которой показано размещение на планшете проб крови от 8-и пациентов на ИФН статус (индукция крови NDV, ФГА), и у 6-и пациентов (№№1-6) – дополнительно к ИФН статусу нужно определить подбор препаратов, т.е. коэффициент стимуляции (КСт) – способность лейкоцитов крови вырабатывать ИФН γ в ответ на стимуляцию их иммуноактивными препаратами, в сравнении с исходно определенной продукцией ИФН γ .

Таблица 1- схематичное расположение проб на **круглодонном** планшете при постановке реакции.

A NDV	B NDV	C NDV	D NDV	E NDV	F NDV	G NDV	H 1
							2
ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	3
ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	ФГА	4
						Кровь Пациента 7	5
ФГА+a	ФГА+a	ФГА+a	ФГА+a	ФГА+a	ФГА+b		6
ФГА+a	ФГА+a	ФГА+a	ФГА+a	ФГА+a	ФГА+b	NDV	7
ФГА+b	ФГА+b	ФГА+сб	ФГА+b	ФГА+с	ФГА+с		8
ФГА+b	ФГА+b	ФГА+b	ФГА+b	ФГА+с	ФГА+с	ФГА	9
ФГА+с	ФГА+с	ФГА+с	ФГА+с	ФГА+d	ФГА+d	ФГА	10
ФГА+с	ФГА+с	ФГА+с	ФГА+с	ФГА+d	ФГА+d		11
Кровь пациента 1	Кровь пациента 2	Кровь пациента 3	Кровь пациента 4	Кровь пациента 5	Кровь пациента 6	Кровь пациента 8	12

Примечание 1- **NDV**- вирус болезни Ньюкасла; **ФГА**- фитогемагглютинин; **а, б, с, д** и др. – заявленные препараты индукторов ИФН и иммуномодуляторы для определения коэффициента стимуляции ими.

2) Определение биологически активной продукции ИФН клетками крови проводят путем титрования ранее стимулированных супернатантов и сыворотки крови пациента на предварительно выращенном монослое клеток Vero или Vero-SF в 96-луночных **плоскодонных** планшетах. Обязательным условием определения продукции биологически активного ИФН является постановка контроля тест-вируса (положительный контроль) и контроля клеток (отрицательный контроль).

Методика титрования:

1. Перед титрованием ИФН из планшетов с монослоем клеток Vero удаляют ростовую среду и в каждую лунку вносят по 100 мкл поддерживающей среды. В планшетах с Vero-SF замены среды не требуется. Для титрования ИФН I типа первое разведение соответствует 1:10, ИФН II типа и сыворотки - 1:2. Дальнейшее титрование проводят с последующими 2-х-кратными разведениями.

2. В день титрования проб на монослое клеток 10-кратно титруют тест-вирус EMC или VSV от 10^{-1} до 10^{-6} для подтверждения активности и выявления рабочего титра тест-вируса.

3. Планшету с протитрованными стимулированными супернатантами, сывороткой крови пациента, а также тест-вирусом закрывают и помещают в CO₂-инкубатор на 24 ч при температуре 37°C и 5 % CO₂.

4. Через 24 ч при просмотре результатов титрования тест-вируса в инвертированном микроскопе выявляют его рабочую дозу в максимальном разведении, при которой деструкция монослоя клеток достигает 100 % (#). В требуемом объеме заражения готовят суспензию вируса, содержащую от 1 до 10 ЦПД (цитопатических доз). Удаляют содержимое планшеты после 24-х-часового инкубирования и вносят приготовленную вирусную суспензию по 100 мкл в каждую лунку планшета, кроме контроля клеток. Планшету с содержимым закрывают и помещают в CO₂-инкубатор на сутки при температуре 37°C и 5 % CO₂.

5. На следующие сутки при положительном контроле дозы вируса (#) проводят визуальный учет результатов в инвертированном микроскопе по защите монослоя клеток от ЦПД тест-вируса.

Определение коэффициента стимуляции (КСт) выработки биологически активного ИФН иммуноактивными препаратами

Внедрение в медицинскую практику иммуноактивных препаратов требует определения их влияния на продукцию биологически активного ИФН [3, 8, 10]. К иммуноактивным препаратам относятся:

- препараты интерферона: -альфа: Виферон, Гриппферон, Интрон, Реальдирон, Реаферон, Роферон и др.; -бета: Бетаферон, Генфаксон, Ребиф, Ронбетал, Синновекс и др.; -гамма: Ингарон. Все эти препараты ИФН используются для ограниченного количества показаний по описанным в инструкциях схемах: вирусные гепатиты, лимфомы, хронический грануломатоз, рассеянный склероз, саркома Капоши, генитальные кондиломы и др. Это все тяжелые хронические и рецидивирующие заболевания онкогенной и аутоиммунной природы, при которых в больших

клинических исследованиях доказана терапевтическая эффективность длительного поддержания уровня ИФН в организме. Следует отметить, что в реакции *in vitro* с клетками крови человека имеется высокая продукция биологически активного ИФН под воздействием препаратов ИФН.

- индукторы ИФН: аллокин-альфа, амиксин, кагоцел, неовир, ридостин, циклоферон и другие.

- иммуномодуляторы: арбидол, галавит, глутоксим, изопринозин, иммунал, иммуномакс, имунорикс, имунофан, ликопид, панавир, полиоксидоний, тактивин, тимоген и другие.

- терапевтические вакцины – ИРС-19, ВП-4, рибомунил, имудон и другие.

На перечисленные иммуноактивные препараты определяется разный коэффициент стимуляции выработки биологически активного ИФН, который может быть различным для каждого пациента.

Коэффициент стимуляции (КС_т) оценивается по нарастанию титров ИФН II типа после воздействия указанных препаратов на лейкоциты периферической крови *in vitro* в сравнении с выработкой ИФН II типа [8, 10] по формуле:

$$КС_t = \frac{\text{ТБА (ИФН}\gamma\text{+ИАП)}}{\text{ТБА ИФН}\gamma},$$

где:

- ТБА (ИФН γ +ИАП) – титр биологической активности ИФН γ после стимулирования иммуноактивным препаратом (ИАП),

- ТБА ИФН γ – исходный титр биологической активности ИФН γ .

Единица измерения КС_т – во сколько раз меняется титр ТБА после стимулирования ИАП.

Данный метод позволяет подобрать более активные препараты для иммунокоррекции при выявлении исходно сниженной продукции биологически активного ИФН γ (ИФН статус). Количественная оценка способствует повышению эффективности терапии.

Методика определения коэффициента стимуляции

Постановка реакции проводится одновременно с постановкой ИФН статуса

1. Реакцию проводят с использованием стерильных 96-луночных круглодонных планшетов, в лунки которых, где будут внесены препараты, вносят по 140 мкл рабочей среды RPMI-1640.
2. Вносят во все лунки, где будут внесены препараты, по 20 мкл ФГА.
3. Добавляют в лунки по 20 мкл того или иного препарата.
4. Затем во все лунки добавляют по 20 мкл цельной гепаринизированной крови и хорошо перемешивают содержимое каждой лунки пипетированием.
5. Планшеты закрывают крышками и инкубируют в CO₂-инкубаторе при 37°C 48ч.
6. После инкубации супернатанты отбирают в стерильные круглодонные планшеты и хранят в холодильнике при температуре (2 – 8)° С до титрования.

Проведение титрования осуществляется на плоскодонном планшете с монослоем клеток в соответствии с примерным схематичным расположением проб (Табл.2) одновременно с супернатантами ИФН статуса.

На планшете показан вариант расположения для титрования проб от 3-х пациентов.

Пациент 1. Титрование простимулированной NDV пробы (ИФН I типа) от 10 до 640 ед/мл; ряд А (1-7). Здесь же ниже титрование сыворотки от 2 до 16 ед/мл; ряд А(8-11). Титрование простимулированной ФГА пробы (ИФН II типа) от 2 до 64 ед/мл; ряд D (1-6). Коэффициент стимуляции препаратов (а,б,с), титрование от 4 до 128 ед/мл: а) ряд D (7-12), б) ряд E (7-12), с) ряд F (7-12).

Пациент 2. Титрование простимулированной NDV пробы (ИФН I типа) от 10 до 640 ед/мл; ряд B (1-7). Здесь же ниже титрование сыворотки от 2 до 16 ед/мл; ряд B (8-11). Титрование простимулированной ФГА пробы (ИФН II типа) от 2 до 64 ед/мл; ряд E (1-6). Коэффициент стимуляции препаратов (а,б), титрование от 4 до 128 ед/мл: а) ряд G (1-6), б) ряд G (7-12).

Пациент 3. Титрование простимулированной NDV пробы (ИФН I типа) от 10 до 640 ед/мл; ряд C (1-7). Здесь же ниже титрование сыворотки от 2 до 16 ед/мл; ряд C (8-11). Титрование простимулированной ФГА пробы (ИФН II типа) от 2 до 64 ед/мл; ряд F (1-6).

Таблица 2 - схематичное расположение проб на плоскодонном планшете с монослоем клеток при биологическом титровании.

А	В	С	D	Е	F	G	Н
ИФН I типа 10	ИФН I типа 10	ИФН I типа 10	Пациент 1 ИФН II типа 2	Пациент 2 ИФН II 2	Пациент 3 ИФН II 2	Пац. 2 ФГА+а 4	1 КК
20	20	20	4	4	4	8	2 КК
40	40	40	8	8	8	16	3 КК
80	80	80	16	16	16	32	4 КК
160	160	160	32	32	32	64	5 КВ/2
320	320	320	64	64	64	128	6 КВ/4
640	640	640	ФГА+а 4	ФГА+б 4	ФГА+с 4	ФГА+б 4	7 КВ/8
Сыворот ка крови 2	Сыворот ка крови 2	Сыворот ка крови 2	8	8	8	8	8 КВ/16
4	4	4	16	16	16	16	9 КВ
8	8	8	32	32	32	32	10 КВ
16	16	16	64	64	64	64	11 КВ
КВ/2	КВ/4	КВ/8	128	128	128	128	12 КВ
Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3	Пациент 1	Пациент 1	Пациент 1	Пациент 2	

Примечание - КК- контроль клеток; КВ- контроль вируса; КВ/2, КВ/4, КВ/8, КВ/16 - кратное (2,4,8,16) разведение контроля вируса.

Интерпретация результатов

Для определения коэффициента стимуляции иммуноактивных препаратов использован подход, основанный на способности препаратов стимулировать сниженную биологически активную продукцию ИФН- γ лейкоцитами крови обследуемого.

ИФН- γ - ключевой цитокин, уровень продукции которого лейкоцитами крови отражает напряженность клеточного противовирусного и антибактериального иммунного ответа.

Оценка биологически активной продукции препарата проводится в сравнении с биологически активной продукцией ИФН- γ без этого препарата, что позволяет выявить разные коэффициенты стимуляции для исследуемых препаратов.

Чем больше препарат стимулирует выработку биологически активного ИФН, тем эффективнее его терапевтическое применение.

Расчет результатов

Результаты анализа записываются на жесткий диск персонального компьютера и имеют возможность быть распечатанными на принтере при выборе оператором соответствующей опции в окне вывода результатов.

1. **Титр биологически активной (функциональной) продукции ИФН (ТБА)** – это величина обратного разведения, при котором задерживается деструкция монослоя клеток от внесенного тест-вируса EMC или VSV, т.е. то максимальное разведение, при котором наблюдается 100 % защита клеток монослоя от ЦПД тест-вируса. Учет результатов проводится по последней лунке 100% защиты монослоя клеток, но, если в следующей лунке титрования имеется 50% защита монослоя, то берется их среднее значение.

2. **Показатели нормы ТБА ИФН:** за средние показатели продукции биологически активного ИФН в норме у взрослых принимаются значения ИФН I типа 640-1280, ИФН II типа – 64-128, сывороточного ИФН <2-8. *Следует отметить, что в отношении детей до 1 года повышенные значения уровня ИФН в сыворотке крови являются физиологической возрастной нормой, также как и 2-кратно сниженные показатели продукции ИФН I и II типов по сравнению с показателями нормы взрослых.*

Референтные значения ИФН статуса представлены в таблице 3.

Таблица 3 - референтные значения ИФН статуса человека.

Показатель титра биологически активной продукции ИФН лейкоцитами крови (ТБА)	Норма для взрослых	Норма для детей до 14 лет
ИФН в сыворотке крови	<2-8	<2-8
ИФН I типа	640-1280	320-640
ИФН II типа	64-128	32-64

Экономическое преимущество метода

В данных методических рекомендациях предложена менее дорогостоящая культура клеток почки зеленой мартышки (Vero), культивируемая на бессывороточной питательной среде [10], сохраняющая чувствительность к ИФН при длительном количестве пассажей. В результате многочисленных повторов метода «ИФН статус» на разных культурах клеток выявлено, что показатели продукции (биологической активности) ИФН I ($\alpha\beta$) и II (γ) типов были одинаковыми как на культуре клеток фибробластов эмбриона человека, так и на культуре клеток Vero, культивируемых на сывороточных и бессывороточных питательных средах. Обычно для культивирования культур клеток требуются питательные среды с добавлением высококачественной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Качество ЭТС варьирует от партии к партии и существует постоянная потенциальная возможность контаминации вирусами, микоплазмами, бактериями и др., что делает невозможным стандартизировать процесс ведения клеточных культур. Преимущество использования клеточной культуры Vero, адаптированной к бессывороточной питательной среде, обеспечивает процесс ведения клеточной культуры в стандартных условиях и снижает себестоимость; не требует замены ростовой среды с 10 % ЭТС на поддерживающую с 2 % ЭТС; сокращает время постановки метода.

Контроль качества

Методика «ИФН статус» сочетает: культуральный метод исследования супернатантов индуцированных лейкоцитов крови с оценкой противовирусной защиты от цитодеструктивного действия индикаторных вирусов при помощи инвертированного микроскопа.

Внутрилабораторный контроль качества

Достоверность результатов исследования зависит от следующих основных параметров:

- 1) состав питательной среды и ростовых факторов, в т.ч. ЭТС: реагенты закупаются ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова; их качество определяется сертификатами поставщика.
- 2) соблюдение стандартности выполнения всех этапов лабораторных процедур: стандартизация процедур определена СОП, разработанными для всех этапов исследования.
- 3) контроль клеточной культуры и её стерильности: при оценке результатов - параметров ИФН статуса - используются 4 выделенные лунки планшета с монослоем клеток, в которые внесена только культура клеток.
- 4) контроль активности индикаторного тест-вируса: при определении контроля активности вируса используются 8-12 выделенных лунок планшета с монослоем клеток, в которые внесен только индикаторный вирус в его рабочем разведении, а также его 2,4,8 и 16-кратные разведения.

Частота проведения контроля качества

Проведение контроля качества проводится параллельно с тестированием клинических образцов.

Достоверность учета результатов

Учет результатов по защите от цитодеструктивного действия вирусов выполняется двумя независимыми исследователями, что позволяет повысить достоверность заключения.

ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Метод «ИФН статус» рекомендуется к применению в здоровой популяции для оценки ИФН-дефицитных состояний и врожденного иммунитета, при заболеваниях различной этиологии, а также в динамике лечения иммуноактивными препаратами для коррекции проводимой терапии.

Показания, при которых необходимо исследование ИФН статуса:

1. вирусные инфекции: острые и хронические формы;
2. аллергические и аутоиммунные заболевания;
3. рецидивирующие оппортунистические инфекции;
4. часто болеющие дети;
5. врожденные и приобретенные дефекты системы ИФН;
6. клинические испытания препаратов ИФН, индукторов ИФН, иммуномодуляторов, вакцин;
7. клиническое применение вышеназванных препаратов и оценка эффективности терапии;
8. разработка индивидуальных схем лечения препаратами ИФН, его индукторами и другими иммуноактивными препаратами.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Противопоказаний нет.

Возможные осложнения при использовании методических рекомендаций и способы их устранения

Возможных осложнений для людей при использовании предложенных методических рекомендаций нет, т.к. этот комплекс лабораторных тестов проводится с кровью пациентов в условиях *in vitro*.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНОВОГО СТАТУСА

Интерпретация результатов

Многолетние исследования ИФН статуса при различных формах патологии позволили установить, что острые воспалительные заболевания часто характеризуются дефицитом продукции α -ИФН (ИФН I типа), хронические, рецидивирующие инфекционные и неинфекционные воспалительные процессы - дефицитом продукции γ -ИФН (ИФН II типа).

Лабораторные исследования крови больных с различными формами патологии, определение коэффициента стимуляции иммуноактивных препаратов по разработанной методике могут использоваться в диагностике ИФН-дефицитных состояний и отборе для их лечения наиболее биологически активных ИФН-продуцирующих препаратов. Это позволяет своевременно разрабатывать индивидуально-оптимальные схемы применения этих препаратов с целью повышения эффективности персонализированного лечения.

При длительном клиническом применении иммуномодулирующих препаратов существует необходимость проведения мониторинга показателей ИФН статуса, как критерия эффективности и контроля предложенной терапии.

При выявлении функциональной неполноценности системы ИФН в различных возрастных группах повышенного риска и при различных патологических состояниях необходима коррекция системы ИФН.

Клинически обоснованная тактика профилактической и лечебной коррекции дефектов системы ИФН с помощью иммуноактивных препаратов (ИФН и его индукторы, вакцины, иммуномодуляторы), позволяет повысить неспецифическую резистентность организма при различных патологических состояниях. Нормализация показателей ИФН статуса обычно совпадает по времени с процессами выздоровления.

Следует заметить, что результаты исследования биологически активной продукции ИФН лейкоцитами крови необходимо рассматривать в комплексе с остальными лабораторными и клинико-анамнестическими данными.

В целом, определение показателей ИФН статуса, особенно в условиях применения иммунотерапии, имеет важное значение, и может быть включено в общую оценку иммунного статуса как здорового, так и больного человека.

Критерии интерпретации результатов

Любой воспалительный процесс инфекционной и неинфекционной природы характеризуется недостаточной способностью лейкоцитов к индуцированной биологически активной выработке ИФН в культурально-вирусологическом методе ИФН статус. В зависимости от тяжести заболевания, клинических проявлений выявляется недостаточность продукции функционального биологически активного ИФН *разной степени выраженности*.

Чем тяжелее заболевание, тем более снижена продукция биологически активного ИФН лейкоцитами крови.

Наиболее простым и доступным суммарным показателем служит количественное определение биологически активной продукции ИФН в сыворотке крови (сывороточный или циркулирующий ИФН). Титры циркулирующего ИФН у здоровых людей в подавляющем большинстве случаев не превышают фоновых значений (≤ 4), т.е. находятся в пределах физиологических концентраций. В норме уровень биологически активного ИФН в сыворотке крови, определенный по методу

ИФН статуса, как правило, характеризуется низкими концентрациями и находится в диапазоне $\leq 2-8$. Повышение суммарного значения ИФН в сыворотке крови (сывороточный ИФН) >8 свидетельствует об остроте воспалительного процесса. Как правило, острые вирусные инфекции в большинстве случаев сопровождаются значительным повышением уровня ИФН в сыворотке крови с первых часов заболевания. В ряде случаев при острых вирусных инфекциях может отсутствовать характерное повышение уровня циркулирующего ИФН. Наиболее частым типом взаимосвязанных нарушений ИФН статуса при различных заболеваниях является различная степень повышения титра циркулирующего ИФН в сыворотке крови с одновременным глубоким подавлением биологически активной ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов. Такая картина может наблюдаться при стрессах, острых вирусных и бактериальных инфекциях (грипп, ОРВИ, микоплазменные пневмонии, гепатит) и рецидивирующих аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, крапивница). При этом биологически активный сывороточный ИФН может быть представлен смесью разных типов ($\alpha, \beta, \gamma, \lambda$) или преимущественно одним типом. Для хронических заболеваний вирусной (герпес, гепатит В) и невирусной природы характерно глубокое подавление биологически активного интерферогенеза. Степень подавления продукции биологически активного ИФН I и II типов лейкоцитами крови указывает на тяжесть хронического процесса, значения которых сочетаются с фоновыми показателями сывороточного ИФН.

В настоящее время при пандемии COVID-19 острое течение заболевания характеризуется глубоким дефицитом биологически активной продукции ИФН I и II типов лейкоцитами крови, составляя «следовые» количества с титром биологически активного (ТБА) ИФН I типа от 2 до 10, ИФН II типа – от 2 до 8. Бессимптомное течение заболевания выражено низкими титрами ИФН I типа (20-40) и ИФН II типа (8-16), что в разы отличается от показателей физиологической нормы.

Результат исследования ИФН-статуса не является клиническим заключением: врачи клинической лабораторной диагностики консультируют практикующих врачей и помогают в интерпретации результатов исследований. Врач-клиницист на основании анамнеза больного, клинических проявлений, лабораторных анализов и исследований, в т.ч. и ИФН статуса, делает общее заключение и назначает соответствующую терапию.

Клиническая информативность лабораторных исследований интерферонового статуса

Клиническая информативность лабораторного метода тестирования биологически активной продукции ИФН I и II типов позволяет оценивать состояние неспецифической резистентности организма, которое является значимым показателем врожденного иммунитета и служит интегральным критерием функционального состояния системы интерферона.

По оценке коэффициента стимуляции (КСт) иммуноактивных препаратов метод дает возможность выбора терапевтически эффективного препарата и проведение дальнейшей оптимальной терапии с мониторингом показателей ИФН статуса в динамике лечения.

Метод **«ИФН статус»** входит в Программу Российского здравоохранения «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многолетние исследования ИФН статуса при различных формах патологии позволили установить, что острые воспалительные заболевания характеризуются преобладанием дефицита продукции биологически активного α/β -ИФН (ИФН I типа), в то время как хронические, рецидивирующие (инфекционные и неинфекционные) – преимущественным преобладанием дефицита продукции γ -ИФН (ИФН II типа). Лабораторные исследования (ИФН статус) больных с различными формами патологии, выявление более эффективных препаратов по разработанной методике использованы в диагностике ИФН-дефицитных состояний и отборе для их лечения адекватных иммуноактивных препаратов. Это позволило своевременно разработать индивидуально-оптимальные схемы их применения и повысить эффективность лечения [5, 7-9, 11, 13, 20].

При клинических испытаниях препаратов ИФН и их индукторов и других иммуноактивных препаратов, и/или при их последующем клиническом применении, существует необходимость проведения мониторинга показателей ИФН статуса, как критерия эффективности и контроля предложенной терапии. Это актуально и при длительной инъекционной терапии препаратами ИФН, например, пегилированного ИФН- α при гепатите С, онкологии, ИФН- β при рассеянном склерозе и т.д.

Все вышесказанное указывает на целесообразность периодического тестирования населения на противовирусный иммунитет. При выявлении функциональной неполноценности системы ИФН в различных возрастных группах повышенного риска и при различных патологических состояниях необходима коррекция системы ИФН. Тактика профилактической и лечебной коррекции дефектов системы ИФН с помощью иммуноактивных препаратов (ИФН и его индукторов, вакцин, иммуномодуляторов), позволяет повысить неспецифическую резистентность организма, его врожденный иммунитет, при различных патологических состояниях и, как правило, обнаруживает корреляцию с клиническими результатами. Нормализация показателей ИФН статуса обычно совпадает по времени с процессами выздоровления.

В целом, **значимость** показателей ИФН статуса велика, особенно при оценке клинического состояния как здорового, так и больного человека. По совокупности показателей ИФН статуса можно оценить степень недостаточности/дефицита системы по способности к выработке биологически активного ИФН лейкоцитами крови или же интерпретировать повышенные уровни циркулирующего ИФН в крови.

Следует принять во внимание тот важный факт, что вовремя назначенное лечение в комплексе с иммуноактивными препаратами приводит в дальнейшем к коррекции показателей ИФН статуса человека и более быстрой клинической стабилизации/выздоровлению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, Том II. М., 2015. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток.
2. Григорян С.С., Майоров И.А., Иванова А.М., Ершов Ф.И. Оценка интерферонового статуса людей по пробам цельной крови// Вопросы вирусологии. 1988; 4: 433-436.
3. Григорян С.С., Оспельникова Т.П., Ершов Ф.И. Определение индивидуальной чувствительности людей к индукторам интерферона и другим препаратам (по воздействию на интерфероновый статус). Методические рекомендации. Москва. 2000; 14с.
4. Ершов Ф.И., Готовцева Е.П., Носик Н.Н. Интерфероновый статус в норме// Иммунология. 1986; 3: 52-54.
5. Ершов Ф.И., Готовцева Е.П., Лаврухина Л.А. Интерфероновый статус при различных заболеваниях//Вопросы вирусологии. 1990; 6: 444-448.
6. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. М., Медицина. 1996, 239 с.
7. Ершов Ф.И., Нестеренко В.Г., Малышев Н.А., Оспельникова Т.П., Сергеева Э.М. Применение препарата Кагоцел для лечения и профилактики острых респираторных вирусных инфекций у взрослых и детей. Методические рекомендации. Правительство Москвы. М., 2014, 14 с.
8. Оспельникова Т.П., Григорян С.С., Ершов Ф.И. Новый подход к отбору иммуноактивных препаратов для лечения// Медицинская иммунология. 2001; 3(2): 332-333.
9. Оспельникова Т.П. Выявление и коррекция интерферондефицита при воспалительных гинекологических заболеваниях//Georgian Medical News. 2012, 11 (212): 24-32.
10. Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. Способ определения продукции интерферонов как параметров врожденного иммунитета. Патент на изобретение РФ №2657808 от 10.07.2017, опубликован: 15.06.2018 г.
11. Оспельникова Т.П., Зарембо Н.В., Конищева А.Ю., Гервазиева В.Б., Осипова Г.Л., Михайлова Н.А. Интерфероновый статус в оценке терапии бронхиальной астмы иммуномодулирующими препаратами//Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019; 3:46-54.
12. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М., Медицина, 1981 – 400 с.
13. Чучалин А.Г., Ершов Ф.И., Осипова Г.Л., Оспельникова Т.П., Лизогуб Н.В. Применение циклоферона (меглумина акридонацетат) в комплексной терапии больных бронхиальной астмой при острых респираторных инфекциях. Методические рекомендации. Правительство Москвы. М., 2012, 13 с.
14. Bocsi V. Production and role of interferon in physiological conditions//Biol Rev Camb Philos Soc. 1981; 56(1): 49-85.
15. Campbell JB, Grunberger T, Kochman MA, White SL. A microplaque reduction assay for human and mouse interferon//Can J Microbiol. 1975; 21(8): 1247-1253.
16. Doldi K, Leroux M, Augustin R, Kirchner H, Kalden JR. Proliferation and interferon production in whole blood samples and isolated lymphocyte preparations//J Interferon Res. 1985; 5(1): 55-64.
17. Ferreira PC, Peixoto ML, Silva MA, Golgher RR. Assay of human interferon in Vero cells by several methods // J ClinMicrobiol.1979; 9(4): 471-475.

18. Isaacs A., Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957 Sep 12; 147(927): 258-267.
19. Kirchner H, Kleinicke C, Digel W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes//J Immunol Methods. 1982; 48(2): 213-219.
20. Ospelnikova TP, Gevorkyan OV, Mironova TV, Andreeva SA, Kolodyazhnaya LV and Ershov FI. Features of Interferon and Cytokine Status in Atopic Dermatitis//Arch Asthma Allergy Immunol. 2017; 1: 009-014.
21. Richmond J.Y., Polatnick J., and Knudsen R.C. Microassay for interferon, using [3H]uridine, microculture plates, and a multiple automated sample harvester//Appl Environ Microbiol. 1980; 39(4): 823–827.
22. Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. Convenient assay for interferons//J Virol. 1981; 37(2): 755-758.
23. Tilles J.G., Finland M. Microassay for Human and Chick Cell Interferons//Applied Microbiology. 1968; 16 (11): 1706-1707.