

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ
К ПРЕПАРАТАМ ИНТЕРФЕРОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
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.Табаков, кандидат биологических наук; **Ф.И.Ершов**, доктор
медицинских наук, профессор, академик РАН

Рецензенты:

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

А.С.Котов– доктор медицинских наук, доцент, руководитель
неврологического отделения Государственного бюджетного учреждения
здравоохранения Московской области «Московский областной научно-
исследовательский клинический институт им. М.Ф.Владимирского»
(МОНИКИ)

Предназначение: методические рекомендации относятся к медицине, области иммунологии, а именно, к лабораторной диагностике, по выявлению наличия и количественной оценке уровня нейтрализующих антител (НАТ) в сыворотке крови больных, длительно получающих высокодозные препараты интерферона (ИФН) (при рассеянном склерозе (РС) – ИФН β , препараты ИФН α – при гепатите В или С, папилломатозе, онкологических заболеваниях и т.п.). Практическим выходом Методических рекомендаций является возможная коррекция выбранной схемы лечения по назначению/замене и количеству используемого препарата ИФН.

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

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

ISBN

© Коллектив авторов 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОПИСАНИЕ МЕТОДА	7
Материально-техническое обеспечение.....	7
Анализируемые образцы.....	7
Проведение исследования	8
Расчет результатов.....	10
Экономическое преимущество метода.....	11
Контроль качества	11
ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	12
ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	12
Возможные осложнения при использовании методических рекомендаций и способы их устранения.....	12
КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДА	13
Критерии интерпретации результатов.....	13
Клиническая информативность лабораторных исследований НАТ.....	14
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	15
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	18

Список сокращений

ИО – исследуемый образец

ИФН – интерферон

КО – контрольный образец

МЕ – международные единицы активности интерферона

НАТ – нейтрализующие антитела к препарату интерферона или интерферон-нейтрализующие антитела

НЕ – нейтрализующие единицы активности интерферона

ЦПД – цитопатическое действие тест-вируса

ЕМС – тест-вирус энцефаломиокардита мышей

Vero – культура эпителиальных клеток почки обезьяны

Vero-SF - адаптированная бессывороточная линия клеток Vero

VSV – тест-вирус везикулярного стоматита

ВВЕДЕНИЕ

Настоящие рекомендации представляют собой изложение алгоритмов исследования и интерпретации количественного определения нейтрализующих антител (НАТ) к препаратам интерферонов (ИФН) в сыворотке крови у пациентов, длительно применяющих инъекционные препараты ИФН. Препараты ИФН входят в стандарты лечения рассеянного склероза (РС), гепатитов В и С, онкозаболеваний. При длительном, многомесячном применении препаратов ИФН в процессе лечения при данных нозологиях возможно образование антител против применяемых препаратов ИФН [6, 13].

Рассеянный склероз - хроническое мультифакториальное прогрессирующее демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы [1, 4]. Терапия, основанная на применении препаратов ИФН β , и используемая с 1990-х годов, позволила изменить течение и прогноз этой болезни. Она проводится в период ремиссии и стабилизации (вне обострения РС) и нацелена на предупреждение обострений при прогрессировании инвалидизации, при ремиттирующем и вторично прогрессирующем течении болезни [1, 4, 7].

Конечно же, определение нейтрализующих антител (НАТ) является серьезной проблемой во многих странах мира у пациентов с РС, получающих препараты ИФН β -1a или ИФН β -1b. В то время как связывающие антитела могут быть обнаружены у подавляющего большинства пациентов РС, только у меньшей части (от 6% до 45%) пациентов развиваются нейтрализующие антитела к препаратам ИФН.

Препараты ИФН β , как и другие биофармацевтические препараты, производимые на белковой основе генно-инженерными технологиями, являются потенциально иммуногенными. Антитела против ИФН β развиваются в результате нарушения иммунной толерантности, ассоциированной с процессами повторного представления антигена [4, 15]. Антитела к ИФН β могут ослаблять или отменять клеточный ответ на ИФН β и способны нейтрализовать терапевтический эффект ИФН β , блокируя активность молекул ИФН на этапе их связывания со специфическими рецепторами [14]. Такие антитела называются нейтрализующими антителами [5, 15].

Сообщается, что НАТ могут быть обнаружены в крови пациентов с РС, получающих ИФН β , уже по истечении 3–6 мес. после начала лечения [1, 15]. Частота их появления зависит от используемых препаратов ИФН β . Так, по данным Т. Е. Шмидт и Н. Н. Яхно (2010), НАТ к ИФН β -1b появляются у 28–45% больных, к ИФН β -1a для подкожного введения — у 11–24%, а к ИФН β -1a для внутримышечного введения — лишь у 2–5% пациентов [1, 4]. В различных публикациях сообщается, что у НАТ-позитивных пациентов с РС (особенно с высокими титрами) существенно снижается эффективность терапии ИФН β [1, 6, 13]. Пациенты с наличием НАТ, особенно с ростом НАТ при проводимой терапии, теряют положительный эффект ИФН β -терапии из-за опосредованного антителами снижения биоактивности препарата ИФН и поэтому такие пациенты могут стать неотвечаемыми на ИФН β -терапию с возникновением резистентности к терапии [15]. Эти сведения подтверждают актуальность выявления НАТ при разных схемах лечения препаратами ИФН и проведения дальнейшей коррекции лечения.

Выявление НАТ основано на специфических функциональных клеточных тестах. При исследовании НАТ *in vitro* D. Hess и соавт. (2007, 2009) использовали тест, получивший название «индукция МхА» [1, 9, 10]. Этот метод позволяет определить способность НАТ, присутствующих в сыворотке крови пациентов, понижать ИФН β -индуцированную экспрессию специфического маркера ИФН — МхА (в форме мРНК или на белковом уровне). Предполагается, что мРНК маркера МхА является наиболее чувствительным показателем при исследовании НАТ [1, 15]. Также методом выявления

НАТ является люциферазное исследование, основанное на использовании клеток фибросаркомы человека с внесенной люциферазной кассетой гена-репортера: при наличии НАТ не происходит связывания молекулы ИФН β с соответствующим рецептором и активации трансклеточного сигнального механизма с последующей транскрипцией гена люциферазы [1, 8]. Однако, перечисленные методы высокочувствительны, требуют специального оборудования и специфических реагентов.

Следует отметить, что к традиционным методам определения активности НАТ к ИФН α , β и γ относится биологическое тестирование путем титрования ИФН-содержащего препарата с сывороткой крови пациента на монослое чувствительной к ИФН культуры клеток с последующей обработкой индикаторным тест-вирусом и анализом его цитопатогенного/цитодеструктивного действия [11, 12].

В настоящих рекомендациях представлена разработанная нами экономически выгодная методика выявления НАТ, основанная на владении техникой культивирования клеток и вирусологических исследований.

Количественное определение НАТ в данном методе основано на биологических методах испытания препаратов ИФН с использованием культур клеток, согласно требованиям Фармакопеи [2]. Из комбинаций клетка/вирус в результате многочисленных исследований нами была выбрана оптимальная. В результате разработан и запатентован метод определения НАТ к препарату ИФН с использованием клеток Vero, адаптированных к бессывороточному ведению [3]. Сущность метода: нейтрализующие антитела (НАТ) в сыворотке крови пациента блокируют активность используемого при длительной терапии препарата ИФН в его оптимальном разведении, при этом регистрируется цитодеструктивное поражение индикаторным вирусом монослоя культуры клеток [3].

Настоящие методические рекомендации описывают последовательность выполнения метода и его результаты на примере пациентов с РС, получавшими длительное лечение препаратами ИФН β . Использование постоянной линии Vero-SF позволяет максимально стандартизовать метод «цитопатического теста» в условиях контролируемого роста клеток в бессывороточной среде, а также отсутствия дополнительных интерферирующих и связывающих сывороточных субстанций ксеногенного происхождения.

В дополнение: EFNS (Европейская федерация неврологических обществ) разработала Рекомендации по определению НАТ к ИФН и их использованию в клинической практике, ввели мониторинг определения НАТ в протокол лечения пациентов РС. Определение НАТ необходимо проводить через 12 и 24 мес после начала лечения ИФН (уровень рекомендаций А). Если за этот период НАТ не будут обнаружены, дальнейшее их определение можно не проводить (уровень рекомендаций В). Пациентам с НАТ следует повторить обследование через 3–6 мес., а в случае повторного обнаружения их роста прекратить терапию препаратами ИФН (уровень рекомендаций А) [15].

Представленные методические рекомендации позволят определить и уточнить подобные точки в динамике лечения препаратами ИФН β пациентов с РС, а также сформулировать подобные Практические рекомендации врачей-неврологов, специалистов по РС, с возможным введением в Протокол исследования по РС определения НАТ в мониторинге лечения.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Материально-техническое обеспечение

Оборудование и материалы.

- CO₂-инкубатор для культивирования клеток при 37°C и содержании CO₂ –3-5%;
- Холодильник бытовой;
- Холодильная камера на –70°C;
- Центрифуга лабораторная;
- Инвертированный микроскоп;
- Ламинарный шкаф с вертикальной подачей стерильного воздуха;
- Пробирки стерильные для сыворотки крови;
- Планшеты кругло- и плоскодонные 96-луночные (стерильные);
- Автоматические пипетки с переменным объемом (до 20 мкл, до 200 мкл);
- Наконечники к автоматическим пипеткам (стерильные).

Среды и добавки к ним.

- Гентамицин 10 мг/мл;
- Бессывороточная среда (ГибриС-1-П и др.);
- Среда DMEM/F12 с глутамином;
- Ростовая добавка BioVer;

Тест-вирус

- Вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС)
- Вирус везикулярного стоматита (VSV)

Культура клеток

- Клетки почки зелёной мартышки Vero
- Vero-SF - адаптированная бессывороточная линия клеток Vero

Анализируемые образцы

Биоматериалом для исследования являются нативные или однократно размороженные после замораживания образцы сыворотки крови. Для проведения исследования в повторях требуется объем сыворотки не менее 250 мкл.

Взятие проб цельной крови следует производить путем обычной венопункции в объеме не менее 3 мл в соответствующие пробирки. Для получения сыворотки крови, после свёртывания крови в пробирке, её центрифугируют в течение 5 мин. при 1000 об/мин. Затем надосадочный биоматериал (сыворотку крови) в стерильных условиях бокса отбирают в эппендорфы.

Для выполнения исследования не допускаются хилёзные и гемолизированные пробы сыворотки крови.

Проведение исследования

Определение НАТ к ИФН должно проводиться в лабораторных условиях с использованием бокса биологической безопасности класса II.

Определение НАТ к препарату ИФН с использованием культуры клеток Vero и Vero-SF

1. Подготовка культуры клеток и реагентов

А. Клетки эпителия почечных канальцев зеленой мартышки (Vero) культивируют в условиях 37°C CO₂-инкубатора в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) в течение 48 час. в лунках плоскодонного 96-луночного планшета в количестве 20-50 тыс.клеток/лунку до получения монослоя.

Б. При культивировании клеток Vero-SF: поддержание линии и все манипуляции проводят в специальной бессывороточной питательной среде для прикрепляемых клеток (Гибрис-1-П или DMEM/F12 с антибиотиком и ростовой добавкой BioVer и др.).

2. Подготовка реагентов

а) Подготовка рабочего раствора питательной среды DMEM/F12: к 450 мл среды добавляют 4 мл антибиотика гентамицина.

б) При культивировании клеток Vero на сывороточной питательной среде готовят ростовую среду (РС), добавляя в DMEM/F12 10 % ЭТС.

в) При культивировании клеток Vero-SF бессывороточного ведения используют готовую питательную среду Гибрис-1-П или среду DMEM/F12 с добавлением ростовой добавки BioVer.

г) Препарат ИФН, используемый пациентом, разводят в среде DMEM/F12 до рабочей концентрации в 2000 МЕ.

д) Контрольную эмбриональную телячью сыворотку и исследуемую сыворотку пациента разводят в 10 раз.

3. Этапы постановки метода количественного определения НАТ

1. В лунки круглодонного 96-луночного планшета вносят по 100 мкл DMEM/F12.

2. Разведенный препарат ИФН в рабочей концентрации 2000 МЕ титруют с 2-кратным разведением до 1 МЕ в 2-х рядах лунок круглодонного 96-луночного планшета по 100 мкл на лунку.

3. В 1-й ряд вносят по 100 мкл разведенной в 10 раз ЭТС (КО); во 2й ряд вносят исследуемую сыворотку пациента (ИО); инкубируют планшет 2 ч в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C.

4. Из лунок плоскодонного планшета с монослоем клеток удаляют ростовую среду и переносят в лунки содержимое (пп.1-3) из круглодонных планшет по 100 мкл. В свободные лунки с монослоем клеток вносят по 100 мкл питательной среды DMEM/F12 и 10-кратно разводят тест-вирус EMC или VSV от 10⁻¹ до 10⁻⁶ для определения его рабочей дозы. На планшете с монослоем клеток оставляют 12 лунок для контролей. В качестве положительного контроля принимают контроль вируса со 100% деструкцией монослоя клеток (#), в качестве отрицательного контроля – культуру клеток (0). Инкубируют планшет в течение 24 ч в CO₂ инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C.

5. Через 24 ч, используя инвертированный микроскоп, определяют рабочую дозу тест-вируса, составляющую 10¹ ТЦД₅₀ в 0,1 мл, и готовят вирусную суспензию на

питательной среде. Содержимое планшет удаляют и вносят по 100 мкл вирусной суспензии во все лунки, кроме лунок, предназначенных для контроля клеток, для тест-вируса и его кратных (2, 4, 8, 16) разведений. Инкубируют заполненные планшеты 22-24 ч в термостате при 37°C и 5% CO₂ до полной деструкции клеток в лунках с контролем вируса.

6. С помощью инвертированного микроскопа через сутки оценивают деструкцию клеток Vero или Vero-SF от действия тест-вируса. Оценку результатов проводят при 100% деструкции монослоя клеток в лунках с контролем вируса. **Наличие НАТ** определяют по сравнению активности НАТ к препарату ИФН в исследуемом образце сыворотки крови пациента относительно активности контрольного образца.

Учет активности нейтрализующих антител в сыворотке крови пациента проводят по их способности блокировать защитное действие тестируемого препарата ИФН на культуре клеток и выражают в нейтрализующих единицах (НЕ):

$$НЕ_{НАТ} = A(МЕ) \times Z, \text{ где}$$

A(МЕ) – максимальная нейтрализуемая доза препарата ИФН, выраженная в международных единицах; Z – разведение сыворотки пациента (10-кратное).

1 НЕ соответствует 1 нейтрализованной единице биологической активности исследуемого препарата ИФН.

Схема расположения на планшете контрольного образца (КО), исследуемых образцов (ИО) и контролей культуры клеток (КК) и контроля вируса (КВ) представлена в Табл.1.

Таблица 1 - схема расположения КО, ИО, контролей на планшете с монослоем клеток.

A 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B КО 500	КО 250	КО 125	КО 63	КО 31	КО 16	КО 8	КО 4	КО 2	КО 1	КО 0	КО 0
C ИО1 500	ИО1 250	ИО1 125	ИО1 63	ИО1 31	ИО1 16	ИО1 8	ИО1 4	ИО1 2	ИО1 1	ИО1 0	ИО1 0
D ИО1 500	ИО2 250	ИО2 125	ИО2 63	ИО2 31	ИО2 16	ИО2 8	ИО2 4	ИО2 2	ИО2 1	ИО2 0	ИО2 0
E КВ	КВ	КВ	КВ	КВ/2	КВ/4	КВ/8	КВ/16	КК	КК	КК	КК
F ИО2 500	ИО3 250	ИО3 125	ИО3 63	ИО3 31	ИО3 16	ИО3 8	ИО3 4	ИО3 2	ИО3 1	ИО3 0	ИО3 0
G ИО2 500	ИО4 250	ИО4 125	ИО4 63	ИО4 31	ИО4 16	ИО4 8	ИО4 4	ИО4 4	ИО4 1	ИО4 0	ИО4 0
H 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Примечание – обозначения:

- КК- контроль клеток; - КВ-контроль вируса;
- КВ/2, КВ/4, КВ/8, КВ/16 - 2, 4, 8 или 16-кратное разведение контроля вируса, соответственно;
- КО- контрольный образец «препарат ИФН+ЭТС»;
- ИО- исследуемый образец «препарат ИФН+сыворотка больного»;

- ИО (1-2)- исследуемые образцы сыворотки в повторах от 2-х пациентов с используемым ими препаратом ИФН.
В Приложении 1 представлен пример схемы титрования препарата ИФНβ с исследуемой сывороткой крови пациентов с РС.

Расчет результатов

Расчет результата исследования выполняется по формуле $HE_{нат} = A (ME) \times Z$, т.е. определяется во сколько раз происходит увеличение активности НАТ против препарата ИФН в исследуемом образце сыворотки крови больного относительно активности контрольного образца. Результаты анализа записываются на жесткий диск персонального компьютера и могут быть распечатанными на принтере при выборе оператором соответствующей опции в окне вывода результатов.

Референтные значения нейтрализующей активности антител к препарату ИФН представлены в таблице 2.

Таблица 2 - референтные значения показателей НАТ к ИФН

Показатели значений НАТ	Нормальные	Низкие	Повышенные
(HE)	0	0-100	>100
		«серая» зона	зона риска

Интерпретация результатов

В случае получения положительного результата (НАТ+) пациенту проводится разъяснение лечащим врачом результатов исследования и назначается повторное исследование через 3-6 месяцев, в зависимости от количественного значения полученных НАТ. Параллельно проводится клиническое наблюдение и обследование. Пациенты, у которых выявлено 2 повторных положительных значения НАТ+, подвержены риску потери эффективности терапии ИФН.

Величина первого положительного результата НАТ+ может быть незначительной, входить в так называемую «серую» зону ($0 < HE < 100$). Для их контроля нужен мониторинг исследования с интервалом каждые 6 месяцев.

После получение второго результата, подтверждающего наличие НАТ к ИФН, рекомендуются исследования сыворотки пациента на наличие НАТ к ИФН в динамике, каждые 3 месяца, в сравнении с клиническим течением заболевания.

Если значение первого положительного результата НАТ+ > 100 , то это означает, что результат входит в так называемую зону «риска» ($HE > 100$).

После получение второго результата, не просто подтверждающего наличие НАТ к ИФН, а его значительный количественный прирост, врач-невролог, ведущий пациента, проводит мероприятия по уточняющей диагностике. Изменение терапии должно быть принято клиницистами, основываясь на клиническом состоянии пациента и клинико-лабораторных тестах.

В Приложении 2 приведен пример определения НАТ у 28 пациентов с рассеянным склерозом, получавшим лечение высокими дозами препаратов ИФНβ.

Экономическое преимущество метода

Метод определения нейтрализующей активности антител к препарату ИФН показывает очевидную экономическую выгоду в сравнении с существующими зарубежными методами выявления НАТ, где используют тест «индукции МхА» [5, 9] или тест с люциферазой [1, 8], включающие в процесс постановки сложные молекулярные конструкции, дорогостоящее оборудование и реактивы, трудоёмкие манипуляции. В представленном методе «Определение активности нейтрализующих антител к препарату ИФН», который сочетает культурально-вирусологический метод исследования сыворотки крови с оценкой цитодеструктивного действия индикаторных вирусов против препарата ИФН при помощи инвертированного микроскопа, используется стандартное лабораторное оборудование, относительно недорогие компоненты, которые выпускают многие производители. Метод может быть выполнен специалистом клинической лабораторной диагностики, владеющим культуральными и вирусологическими методами исследования.

Контроль качества

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 параметров НАТ к препаратам ИФН используются 4 отдельные, выделенные в качестве контрольных, лунки планшета с монослоем клеток, в которые внесена *только культура клеток*.
- 4) контроль активности индикаторного вируса: при определении контроля активности вируса используются отдельные 8-12 лунок планшета с монослоем клеток, в которые внесён *только индикаторный вирус в его рабочем разведении, а также его 2, 4, 8, 16-кратные разведения*.

Частота проведения контроля качества

Проведение контроля качества проводится параллельно с тестированием клинических образцов.

Достоверность учета результатов

Учет результатов по цитодеструктивному действию вирусов против защитного действия препарата ИФН выполняется двумя независимыми исследователями, что позволяет повысить достоверность заключения.

ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

- 1) Длительное применение высокодозных препаратов ИФН (рассеянный склероз, гепатиты В и С, папилломатоз, онкологические заболевания и др.): определение НАТ (количественная характеристика) является важным критерием оценки эффективности ИФН-терапии в связи с развитием резистентности к препаратам. Метод рекомендуется применять при сроке свыше 3-6 месяцев применения высокодозных препаратов ИФН в целях корректировки проводимой терапии, вплоть до замены препарата. При решении вопроса о замене препарата или его дозы необходимо учитывать уровень НАТ, мнение специалистов-клиницистов и других подтверждающих тестов (например, МРТ с контрастом при РС).
- 2) В целях недопущения возникновения резистентности к длительно применяемому препарату ИФН и контроля терапии рекомендуется применять метод количественного определения нейтрализующей активности антител к длительно применяемому инъекционному препарату ИФН каждые 6 месяцев после начала лечения.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Противопоказаний нет.

Возможные осложнения при использовании методики и способы их устранения

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

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДА

Критерии интерпретации результатов

Основным критерием считается показатель нейтрализующей активности антител к ИФН в сыворотке крови, блокирующей биологическую активность препарата ИФН, и позволяющий выразить степень этой активности в количественном выражении НАТ к ИФН.

Алгоритм интерпретации результатов определения НАТ приведен в таблице 3.

Практическим результатом диагностической процедуры с использованием заявленного метода ИФН-НАТ является коррекция выбранной схемы лечения по назначению/замене и количеству используемого препарата ИФН.

В Приложении 2 приведен пример исследования статуса НАТ-ИФН β в сыворотке крови 28 больных РС, получавших длительное лечение препаратами ИФН β .

Таблица 3 - алгоритм интерпретации результатов метода НАТ к ИФН.

Показатель НАТ к ИФН, выраженный в НЕ	Интерпретация результатов анализа	Комментарии
0	НАТ к ИФН в сыворотке крови не выявлены	Норма
1-100 (\pm)	Низкие значения НАТ к ИФН в сыворотке крови. Для подтверждения положительного результата НАТ рекомендуется повторное исследование через 6 месяцев терапии ИФН	«серая» зона: Значение показателя ИФН-НАТ в «серой зоне» ($0 < \text{НАТ (НЕ)} < 100$) указывает на возможное начало образования интерферон нейтрализующих антител, что требует динамического клинического наблюдения. В таких случаях показано повторное определение НАТ к ИФН через 6 месяцев.
>100 (+)	Повышенные значения НАТ к ИФН в сыворотке крови. Для подтверждения положительного результата НАТ рекомендуется повторное исследование через 3 месяца терапии ИФН	зона «риска»: при НАТ(НЕ) >100 необходимо повторное, подтверждающее результат, исследование сыворотки на НАТ через 3 месяца. Если идет нарастание, то врачами-клиницистами решается вопрос о замене/прекращении лечения этим препаратом.

Клиническая информативность лабораторного исследования НАТ

Клиническая информативность метода количественного определения нейтрализующих антител к препарату ИФН заключается в выявлении НАТ, определении их количественного содержания, возможности мониторинга у НАТ-положительных пациентов для своевременного назначения или замены ИФН-терапии.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методические рекомендации относятся к иммунологии, а именно, к лабораторной диагностике. Методика выявления НАТ и количественная оценка уровня нейтрализующих антител в сыворотке крови больных, длительно получающих инъекционные препараты ИФН, например, при рассеянном склерозе (РС) препараты ИФН β , при гепатитах В или С - препараты ИФН α , папилломатозе, онкологических заболеваниях и т.п.) помогает лечащему врачу своевременно оценивать эффективность препаратов ИФН при данных заболеваниях, когда интерферонотерапия является основным методом лечения. При долговременном применении препаратов ИФН, которые являются белками и обладают свойством иммуногенности, может развиться резистентность к лечению этими препаратами.

Определение нейтрализующих антител методом ИФН-НАТ путем сравнения увеличения активности НАТ к препарату ИФН в исследуемом образце сыворотки крови пациента относительно активности контрольного образца, предоставляет возможность получать информацию о наличии нейтрализующих антител к препарату, что свидетельствует о возникновении возможной резистентности к лечению, а также помогает контролировать течение болезни.

Практическим выходом Методических рекомендаций является возможная коррекция выбранной схемы лечения по назначению/замене и количеству используемого препарата ИФН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурсагова Б.И., Пак Л.А., Студеникин В.М., Кузенкова Л.М. Проблема нейтрализующих антител в терапии рассеянного склероза//Педиатрическая фармакология. 2011; 8 (5): 61-64.
2. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, Том II. М., 2015. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток.
3. Оспельникова Т.П., Колодяжная П.В., Табаков В.Ю., Ершов Ф.И. Способ определения нейтрализующих антител в сыворотке крови больных рассеянным склерозом, леченных препаратами интерферона-бета. Патент на изобретение РФ №2626832 от 02.03.2016, опубликован: 02.08.2017.
4. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз: руководство для врачей. 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ. 2010 - 272 с.
5. Hartung H., Munschauer F., Schellekens H. Significance of neutralizing antibodies to interferon beta during treatment of multiple sclerosis: expert opinions based on the Proceedings of an International Consensus Conference//European Journal of Neurology 2005, 12: 588–601.
6. Bertolotto A., Capobianco M., Amato M.P., et al. Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: report from the Italian Multiple Sclerosis Study group// Neurol. Sci. 2014; 35 (2): 307-16.
7. Damal K., Stoker E., Foley J.F. Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action// Biologics. 2013; 7: 247-258.
8. Farrell R., Espasandin M., Lakdawala et al. Incorporation of an interferon-beta neutralizing antibody assay into routine clinical practice//Mult. Scler. 2011; 17: 1333-1340.
9. Hesse D., Sellebjerg F., Sorensen P.S. Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioavailability//Neurology. 2009; 73: 372-377.
10. Hesse D., Sorensen P.S. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy//Eur. J. Neurol. 2007; 14: 850-859.
11. Lallemand C., Meritet J.F., Erickson R., et al. Quantification of neutralizing antibodies to human type I interferons using division-arrested frozen cells carrying an interferon-regulated reporter-gene//J. Interferon Cytokine Res. 2008; 28 (6): 393-404.
12. Massart C., Gibassier J., Oger J., et al. Neutralizing antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: analytical evaluation for validation of a cytopathic effect assay//Clin. Chim. Acta. 2006; 377: 185-191.
13. Mufarrege EF, Giorgetti S, Etcheverrigaray M, Terry F, Martin W, De Groot AS. De-immunized and Functional Therapeutic (DeFT) versions of a long lasting recombinant alpha interferon for antiviral therapy//Clin Immunol. 2017;176:31-41. doi: 10.1016/j.clim.2017.01.003.
14. Noronha A. Neutralizing antibodies to interferon//Neurology. 2007; 68 (12): 16-22.
15. Sorensen P. S. Neutralizing antibodies against interferon-beta//Ther. Adv. Neurol. Disord. 2008; 1: 62-78.

Пример 1 - схема титрования препарата ИФН β с исследуемой сывороткой крови пациентов с рассеянным склерозом (таблица 4).

Таблица 4 - схема титрования препарата ИФНβ на клетках Vero с исследуемой сывороткой крови пациентов с РС и интерпретацией результатов

№ п/п	Доза препарата ИФНβ в МЕ 2000	Показатель цитопатического действия индикаторного тест-вируса (от защиты монослоя клеток 0 до полной деструкции монослоя клеток #)			
		Препарат ИФН с контрольной ЭТС (КО)	Препарат ИФН с сывороткой пациента №1 (ИО1)	Препарат ИФН с сывороткой пациента №2 (ИО2)	Препарат ИФН с сывороткой пациента №3 (ИО3)
1	500	0	0	0	0
2	250	0	0	0	0
3	125	0	0	0	0
4	63	0	0	0	#
5	31	0	0	0	#
6	16	0	0	0	#
7	8	0	0	0	#
8	4	0	0	#	#
9	2	0	0	#	#
10	1	0	0	#	#
11	0	#	#	#	#
12	0	#	#	#	#

Примечание - в лунке 11 контрольного ряда отмечена полная деструкция монослоя клеток (#), что говорит о прекращении защитного действия ИФН.

Интерпретация результатов таблицы 4

Пациент №1: в сыворотке крови не выявлены НАТ к тестируемому препарату ИФН.

Пациент №2: в сыворотке крови выявлены НАТ к ИФНβ в незначительном количестве, входящие в интервал низких значений, составляющие 40 НЕ. Наблюдение в динамике лечения с повторной сдачей анализа через 6 мес.

Пациент №3: в сыворотке крови выявлены НАТ к ИФНβ в количестве 630 НЕ, способные блокировать 630 лабораторных МЕ препарата ИФНβ. Пациенту рекомендовано или повторное исследование сыворотки через 3 месяца на количественное подтверждение НАТ, или смена терапии препарата, т.к. значение НАТ входит в «зону риска».

Пример 2: исследование статуса НАТ-ИФН β в сыворотке крови 28 больных РС, получавших длительное лечение препаратами ИФН β .

В примере представлены результаты определения НАТ сыворотки крови 28 пациентов. У всех пациентов был поставлен диагноз РС, согласно обновленным критериям W.J.MacDonald в модификации 2010 г., (ремиттирующее течение у 23 пациентов, вторично-прогредиентное течение у 5 в стадии неполной ремиссии заболевания). Пациенты проходили лечение в неврологическом отделении МОНИКИ.

Результаты объективного неврологического обследования оценивали по общепринятой шкале клинической оценки функционального состояния проводящих систем при этом заболевании, предложенной J.Kurtzke, и шкале инвалидизации EDSS (Expanded Disability Status Scale).

Пациенты: женщины n=16, мужчины n=12, с продолжительностью болезни $7,63 \pm 4,87$ лет, легкой и, в основном, средней степени тяжести ремиттирующего течения (EDSS в ремиссии в среднем составила $2,96 \pm 1,14$ баллов); тяжелой степени при ВПТ (EDSS $6,2 \pm 0,27$ баллов). Пациенты получали препараты рекомбинантного ИФН β -1b в дозе 8 - 9 млн МЕ.

Все пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от продолжительности приема препарата: 1 группа – 0.5-1 год; 2 группа – 1-2 года; 3 группа – более 2 лет.

Проведено определение содержания НАТ в сыворотке крови пациентов по результатам реакции нейтрализации антивирусной активности препарата ИФН β методом цитопатогенного теста. Оценку ИФН β нейтрализующей активности (НА) в сыворотках крови пациентов проводили на Vero-SF и оценивали в нейтрализующих единицах (НЕ). Результаты определения ИФН β -НАТ у пациентов всех 3-х групп представлены в Таблице 5, где нейтрализующая активность сыворотки пациентов против ≥ 1000 МЕ препарата в 1-й группе составила 10%, во 2-й группе – 36%, в 3-й группе – 43%.

Интерпретация результатов примера

По результатам НАТ можно видеть, что частота высоких значений количества НАТ во второй группе (длительность приема от 1 до 2 лет) и особенно в третьей группе (длительность приема препаратов свыше 2 лет) существенно выше, чем в первой группе (длительность приема от 0,5 до 1 года). Результаты нашего исследования при рассеянном склерозе показывают, что вероятность образования специфических НАТ и их содержание в сыворотке периферической крови пациентов увеличивается в течение более длительного применения препаратов ИФН, что может существенно понижать эффективность терапии и требует корректировки - изменения препарата или доз, в зависимости от клинического течения.

Исследование сыворотки на наличие НАТ к ИФН может применяться с целью контроля терапевтического эффекта ИФН при проведении стандартного лечения при РС и др. заболеваниях и с целью контроля резистентности к терапии. Следует отметить, что клинически значимые НАТ к ИФН появляются в течение 12-18 мес. после начала терапии ИФН и очень важно проводить регулярные исследования сыворотки на количественное определение НАТ к применяемому препарату ИФН [1, 12, 14, 15].

Таблица 5 - значения НАТ у пациентов РС

№№ пациента/ группа по длительности приема препарата	Тест Vero-SF	Заключение
1 группа – 0.5-1 год		
1/1	120	Зона «риска»
2/1	0	Норма
3/1	0	Норма
4/1	0	Норма
5/1	4	Норма
6/1	0	Норма
7/1	1250	зона «высокого риска»
8/1	0	Норма
9/1	240	зона «риска»
10/1	30	«серая» зона
2 группа – 1-2 года		
1/2	1250	зона «высокого риска»
2/2	0	Норма
3/2	120	зона «риска»
4/2	0	Норма
5/2	0	Норма
6/2	1250	зона «высокого риска»
7/2	320	зона «риска»
8/2	2500	зона «высокого риска»
9/2	630	зона «риска»
10/2	1250	зона «высокого риска»
11/2	60	«серая» зона
3 группа – более 2 лет		
1/3	12000	зона «высокого риска»
2/3	0	Норма
3/3	160	зона «риска»
4/3	1250	зона «высокого риска»
5/3	630	зона «риска»
6/3	10000	зона «высокого риска»
7/3	120	зона «риска»