



Association of laboratory
specialists and organizations
«Federation of Laboratory Medicine»

Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение нейтрализующей активности антител к препаратам интерферонов в сыворотке крови больных, получающих интерферонотерапию

Тип практических рекомендаций:
Правила проведения и интерпретации клинических лабораторных исследований

Москва, 2018

Разработчики:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова» (ФГБНУ **НИИВС** им.И.И.Мечникова), Москва;

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи» (ФГБУ «**НИЦЭМ** им.Н.Ф.Гамалеи») Минздрава России, Москва

Т.П.Оспельникова, Л.В.Колодяжная, В.Ю.Табаков
Под редакцией академика РАН, профессора **Ф.И.Ершова**

Ответственный разработчик:

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»

Рецензенты:

Кочетов А.Г. – президент Ассоциации «ФЛМ», д.м.н., профессор РУДН, заместитель генерального директора ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ, главный внештатный специалист МЗ РФ по клинической лабораторной диагностике

Лянг О.В. – вице-президент Ассоциации «ФЛМ», к.б.н., доцент РУДН, проректор АНО ДПО «Институт лабораторной медицины»

Ключевые слова: интерферон, нейтрализующие антитела к интерферону, биологический метод тестирования, рассеянный склероз, гепатиты

Настоящие практические рекомендации представляют собой изложение алгоритмов исследования и интерпретации количественного определения интерферон-нейтрализующих антител (ИФН-НАТ) сыворотки крови методом биологического тестирования в культуре клеток при воздействии тест-вируса с целью оценки эффективности проводимой интерферонотерапии у больных, длительно применяющих высокодозные инъекционные препараты интерферона.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Методология	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Исследования по применению метода.....	10
ОПИСАНИЕ МЕТОДА.....	12
Материально-техническое обеспечение.....	13
Анализируемые образцы.....	14
Проведение исследования	14
Расчет результатов.....	18
ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	18
ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА	19
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
Критерии для интерпретации результатов по количественной оценке нейтрализующих антител к препарату интерферона	21
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	23

Список используемых сокращений

ИО – исследуемый образец

ИФН – интерферон

ИФН-нАТ – интерферон-нейтрализующие антитела или нейтрализующие антитела к препарату интерферона

КО – контрольный образец

РКИ – рандомизированные контролируемые исследования

МЕ – международные единицы активности интерферона

НЕ – нейтрализующие единицы

ФЛЭЧ – фибробласты легкого эмбриона человека

ЦПД – цитопатическое действие тест-вируса

ЕМС – тест-вирус энцефаломиокардита мышей

Vero – культура эпителиальных клеток почки обезьяны

VSV – тест-вирус везикулярного стоматита

Методология

Методы, использованные для сбора/селекции доказательств

Доказательной базой для составления рекомендаций явился поиск данных в электронных базах PubMed и Medline, электронной библиотеке (www.e-library.ru), а также авторские исследования. Данные практические рекомендации подготовлены на основе согласованного мнения членов ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», а также на основании международных и российских обзорных статей, статей с анализом результатов клинико-лабораторных исследований, обобщения опыта авторов, собственных рандомизированных и нерандомизированных исследований.

Оценка уровня доказательности и значимости рекомендаций проводилась в соответствии с рейтинговой системой – таблицы 1 и 2.

Таблица 1. Рейтинговая схема для оценки достоверности данных.

Степень рекомендации	Описание уровней достоверности
А Высокая достоверность	Основана на заключениях систематических обзоров рандомизированных контролируемых испытаний. Систематический обзор получают путём системного поиска данных из всех опубликованных клинических испытаний, критической оценки их качества и обобщения результатов методом мета-анализа
В Умеренная достоверность	Основана на результатах, по меньшей мере, одного независимого рандомизированного контролируемого клинического испытания
С Ограниченная достоверность	Основана на результатах, по меньшей мере, одного клинического испытания, не удовлетворяющего критериям качества, например, без рандомизации
Д Неопределённая достоверность	Утверждение основано на мнении экспертов; клинические исследования отсутствуют

Клиническая информативность лабораторных исследований

Клиническая информативность лабораторного исследования количественного определения нейтрализующих антител к препарату ИФН заключается в выявлении количественного содержания нАТ, их мониторинговании у нАТ-позитивных пациентов для своевременного назначения или замене ИФН-терапии.

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

Таблица 2. Рейтинговая схема для оценки силы доказательств.

Уровни доказательств	Описание
1++	Мета-анализы высокого качества, систематические обзоры рандомизированных контролируемых исследований (РКИ) или РКИ с очень низким риском систематических ошибок
1+	Качественно проведенные мета-анализы, систематические или РКИ с низким риском систематических ошибок
1-	Мета-анализы, систематические или РКИ с высоким риском систематических ошибок
2++	Высококачественные систематические обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований. Высококачественные обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований с очень низким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2+	Хорошо проведенные исследования случай-контроль или когортные исследования со средним риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2-	Исследования случай-контроль или когортные исследования с высоким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
3	Неаналитические исследования (например: описания случаев, серий случаев)
4	Мнение экспертов

Индикаторы доброкачественной практики

Рекомендуемая доброкачественная практика базируется на клиническом и лабораторном опыте членов рабочей группы по разработке рекомендаций.

Экономический анализ

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» [1, 2], тест с люциферазой [3, 4], включающие в процесс постановки сложные молекулярные конструкции, дорогостоящее оборудование и реактивы, трудоёмкие манипуляции.

Метод валидации рекомендаций:

В рамках организации контроля качества большое внимание необходимо уделять разработке и внедрению на рабочих местах стандартных операционных процедур (СОП).

- Внешняя экспертная оценка

Внешний контроль качества осуществляется в форме участия в межлабораторных сличениях с постановкой контрольных образцов (К- (клетки) и К+ (вирус)).

- Внутренняя экспертная оценка

Внутрилабораторный контроль представляет собой систему внутрилабораторных сличений получаемых в лаборатории результатов. Для этого в каждой постановке тестируются контрольные образцы: К+ и К-.

Внутрилабораторный контроль включает следующие специализированные процедуры:

- постоянная оценка контрольных образцов К- и К+ в каждой постановке методики,
- периодическое проведение повторного испытания (выполняется двумя сотрудниками параллельно при введении новой серии реагентов),
- использование контрольных образцов для внутрилабораторного контроля качества (данный вид контрольных процедур рекомендуется проводить при введении нового набора реагентов).

ВВЕДЕНИЕ

Настоящие практические рекомендации представляют собой изложение алгоритмов исследования и интерпретации количественного определения нейтрализующих антител (нАТ) к препаратам интерферонов (ИФН) в сыворотке крови у больных, длительно применяющих высокодозные инъекционные препараты ИФН, биологическим методом, который может применяться с целью диагностики, мониторинга нарушений и оценки эффективности проводимой интерферонотерапии.

Предложенный метод позволяет *in vitro* проводить диагностическое количественное определение нАТ к длительно применяемому препарату ИФН, особенно при резистентности к проводимой терапии. Метод может применяться в клинических лабораториях специализированных лечебных заведений с целью контроля интерферонотерапии для последующей корректировки применяемого лечения и с

целью своевременного прекращения лечения проводимым препаратом ИФН, переходом на другую терапию, применяемую для пациентов данной нозологии. Метод относится к области медицины, а именно, к лабораторной диагностике количественного определения интерферон-нейтрализующих антител (ИФН-нАТ) в сыворотке крови больных, длительно получающих высокодозные инъекционные препараты интерферонов (ИФН) α и β при рассеянном склерозе, гепатите В или С, папилломатозе, онкологических заболеваниях и т.п.

С помощью анализа ИФН-нАТ измеряют способность сыворотки пациентов, принимающих терапию препаратом ИФН, нейтрализовать биологический эффект этого препарата ИФН и на основании полученных биологических параметров количественно определить активность нейтрализующих антител, не позволяющих интерферону эффективно связываться с рецептором и/или активировать его, тем самым блокируя его биологические эффекты и ингибируя терапевтическую эффективность [5]. Нейтрализующие антитела к ИФН определяют по их способности нейтрализовать ИФН-биологическую активность на чувствительных линиях клеток [5]. Величина показателя нейтрализующей активности сыворотки крови пациента к ИФН выражается в нейтрализующих единицах, соответствующих экспериментальным лабораторным единицам подавления активности препарата ИФН в МЕ/мл.

Как известно, препараты ИФН входят в стандарт лечения таких тяжелых хронических заболеваний, как рассеянный склероз, вирусные гепатиты В или С, герпетическая инфекция, онкологические заболевания и др. Вышеуказанные заболевания сопровождаются развитием дефицита системы ИФН, характеризующимся подавлением функциональной способности клеток крови к продукции ИФН I и II типа [6]. Поэтому эффективность применения препаратов ИФН при этих заболеваниях обусловлена не только их противовирусным, но и, что особенно важно, иммуномодулирующим действием на сопутствующие хронические воспалительные процессы. ИФН формирует защитный барьер на пути вирусов и других микроорганизмов намного раньше специфических защитных реакций иммунитета, стимулируя клеточную резистентность. ИФН регулируют экспрессию многих генов и активность клеток иммунной системы совместно с другими цитокинами.

Человеческие рекомбинантные ИФН синтезируются бактериальными штаммами, в генетический аппарат которых встроены ген ИФН человека. Медицинские препараты интерферона по составу делятся на α -, β - и γ -ИФН и проявляют клинически доказанную эффективность при широком спектре заболеваний различного генеза.

Фармакологические препараты на основе ИФН возглавляет ИФН α (Альфарон, Интрон А, Реаферон-ЕС, Реаферон-ЕС-Липинт, Реальдирон, Роферон А, Пегинтрон, Пегасис и другие), который применяют при заболеваниях вирусной природы: гепатитах В, С, Д, герпесвирусах, острых респираторных вирусных инфекциях и др. [6, 7, 8].

Препараты ИФН- β (Авонекс, Бетаферон, Генфаксон, Инфибета, Ребиф, Ронбетал, Синновекс) с успехом применяются для лечения рассеянного склероза [1, 9]. Препараты ИФН- γ (Гаммаферон, Ингарон) используются для терапии пациентов с хроническими заболеваниями различной этиологии, в патогенезе которых значительную роль играет выраженная дисфункция иммунной системы, таких как хронический гранулематоз [10], остеопороз [11], атопический дерматит [12], ревматоидный артрит, системная красная волчанка [13], туберкулез [14]. Препараты на основе ИФН- λ в настоящее время проходят клинические испытания как средства терапии вирусного гепатита С и всесторонне изучаются в качестве перспективных противоопухолевых препаратов [15].

При длительном применении препаратов ИФН- α , β развивается ряд побочных эффектов, затрагивающих в той или иной степени практически все жизненно важные органы и системы с образованием антител, частично нейтрализующих действие самих препаратов ИФН [1, 5, 16, 17].

Поскольку препараты ИФН являются белковыми субстанциями генно-инженерных технологий, они потенциально иммуногенны и длительная стимуляция иммунной системы может приводить к образованию антител против ИФН [15, 16, 18-21]. Эффекторами иммунного ответа на введение терапевтических препаратов ИФН выступают т.н. нейтрализующие антитела (НАТ), блокирующие активность молекул ИФН на этапе их связывания со специфическими рецепторами [5, 19].

Несмотря на общую целесообразность использования ИФН β для профилактики инвалидизации у лиц молодого возраста, составляющих основную часть популяции больных с РС, в ряде случаев терапия ИФН β не эффективна. Основными причинами неэффективности (резистентности к терапии) являются либо агрессивное течение РС, либо возникновение нейтрализующих антител к применяемому препарату ИФН β [5, 17, 19].

Нейтрализующие антитела могут быть обнаружены в крови пациентов с РС, получающих ИФН β , уже через 3–6 мес. после начала лечения [1, 19, 20]. Частота их появления зависит от иммуногенности используемых препаратов ИФН β . Так, по данным Т. Е. Шмидт и Н. Н. Яхно, НАТ к ИФН β -1b появляются у 28–45% больных, к

ИФНβ-1а при подкожном введении — у 11–24%, а к ИФНβ-1а при внутримышечном введении — лишь у 2–5% пациентов [18, 20].

В различных публикациях сообщается, что у пациентов с РС с высокими показателями нАТ существенно снижается эффективность терапии ИФНβ [5, 17, 20].

За рубежом для выявления нАТ используют тест «индукции МхА» [1, 2, 21], тест с люциферазой [3, 4, 20], включающие в процесс постановки сложные молекулярные конструкции и дорогостоящее оборудование.

В то же время к традиционным методам определения активности нАТ к ИФН-α, -β относится биологическое тестирование путем титрования либо сыворотки пациента с постоянной дозой препарата ИФН, либо препарата ИФН с постоянным разведением сыворотки на монослое чувствительной к ИФН культуры клеток с последующей обработкой тест-вирусом и анализом его цитопатического действия [1, 4, 5, 19, 22].

Нами разработана методика выявления нАТ к ИФН, которая основана на владении техникой культивирования клеток и вирусологических методов.

В связи с выше сказанным авторы настоящих рекомендаций предлагают метод *количественного определения интерферон-нейтрализующих антител* в сыворотке крови у больных, применяющих препараты ИФН, высокое содержание которых может являться биомаркёром контроля течения заболевания.

Исследования по применению метода

Для установления и уточнения диапазона допустимых значений нейтрализующей активности антител к ИФН (далее, как **ИФН-нАТ**) в сыворотке крови популяции здоровых людей были проведены исследования:

- Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ») Минздрава России, Москва; 2012-2016 гг.; исследовали образцы сыворотки здоровых доноров-добровольцев, включающие сыворотки 22 женщин и 3 мужчин в возрасте от 27-и до 65-и лет; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва; 2013-2014 гг., исследовали образцы сыворотки крови здоровых доноров-добровольцев, включающие сыворотки 10 женщин в возрасте от 33-х до 53-х лет;

- Государственное автономное учреждение здравоохранения "Республиканский клинический неврологический центр", Казань; 2013 г.; исследовали образцы сыворотки здоровых доноров-добровольцев (6 человек), включающие 4 женщин и 2 мужчин в возрасте от 25-и до 38-и лет.

Для оценки перспективности применения метода ИФН-нАТ в качестве лабораторного теста количественного определения нАТ в сыворотке крови больных к препарату ИФН, длительно применяемого в терапии, а также мониторинга образования нАТ в процессе лечения ИФН и их своевременного выявления у пациентов с РС, были проведены клинические испытания:

- Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф.Владимирского» (МНИКИ), неврологическое отделение, Москва совместно с ФГБУ «НИЦЭМ» им.Н.Ф.Гамалеи Минздрава России и ФГБНУ НИИВС им.И.И.Мечникова, Москва; 2013-2017 гг.; обследовали группу из 45-и пациентов с РС (13 мужчин и 32 женщины в возрасте от 22-х до 53-х лет), находящихся на ИФНβ-терапии; сыворотки этих больных исследовали методом ИФН-нАТ. Дизайн исследования: одноцентровое контролируемое клиническое исследование.
- Государственное автономное учреждение здравоохранения "Республиканский клинический неврологический центр", Казань совместно с ФГБУ «НИЦЭМ» им.Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва; 2013 г.; исследованы образцы сыворотки крови от 15-и пациентов с РС (3 мужчин и 12 женщин в возрасте от 25-и до 60-и лет) после 3-х-годичного лечения препаратом ИФНβ-1b. Дизайн исследования: в рамках одноцентрового рандомизированного контролируемого выборочного клинического исследования.
- Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф.Владимирского» (МНИКИ), неврологическое отделение, Москва совместно с ФГБУ «НИЦЭМ» им.Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва; 2012-2015 гг.; в динамике лечения препаратом ИФНβ-1a обследовали группу из 18-и пациентов с РС (2 мужчины и 16 женщин в возрасте от 20-и до 56-и лет) с

длительностью заболевания от 1 года до 15 лет; проводили мониторинг 126 сывороток пациентов в повторах методом ИФН-нАТ до лечения, через 3, 6, 9, 12, 24, 36 мес. непрерывной терапии препаратом ИФНβ-1а. Дизайн исследования: одноцентровое контролируемое клиническое исследование.

- Государственное автономное учреждение здравоохранения "Республиканский клинический неврологический центр", Казань совместно с ФГБУ «НИЦЭМ» им.Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва; 2013 г.; исследованы образцы сыворотки крови от 9-и пациентов с РС в динамике лечения препаратом ИФНβ-1b (2 мужчин и 7 женщин в возрасте от 20-и до 53-х лет); проведено мониторинг 18 сывороток пациентов в повторах методом ИФН-нАТ до лечения и через 2-3 мес. непрерывной терапии препаратом ИФН с целью раннего выявления нАТ к ИФН. Дизайн исследования: в рамках одноцентрового рандомизированного контролируемого выборочного клинического испытания.

Согласно рекомендациям Фармакопеи, в данной методике использованы чувствительные к ИФН клетки и тест-вирусы к ним [23]. Используемые в методе чувствительные к ИФН клетки позволяют обнаруживать концентрации различных подтипов специфических ИФН и их пегилированных вариантов от <1,0 МЕ/мл до >100 МЕ/мл.

Оценку результатов анализа проводили визуально с использованием инвертированного микроскопа. Для получения более точных результатов ИФН-нАТ пробы протитрованы в повторах, к тому же, для проверки воспроизводимости показателей протитрованы пробы одних и тех же замороженных сывороток пациентов через год и получены аналогичные результаты.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Количественное определение нАТ основано на биологических методах испытания препаратов ИФН с использованием культур клеток, согласно требованиям Фармакопеи [23]. Из предложенных комбинаций клетка/вирус нами апробированы клетки фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ и ФЛЭЧ), клетки почки быка MDBK, клетки почки свиньи СПЭВ, клетки эпителия почечных канальцев зеленой мартышки Vero и тест-вирусы энцефаломиокардита мышей EMC или вирус везикулярного стоматита VSV.

нАТ в сыворотке крови пациента блокируют активность используемого для терапии препарата ИФН в его оптимальном разведении, которое способствует цитодеструктивному поражению тест-вирусом монослоя культуры клеток (Патент на изобретение РФ №2626832 от 02.03.2016, опубликован: 02.08.2017 г.).

Материально-техническое обеспечение метода

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

Оборудование и лабораторная посуда/пластик.

- CO₂-инкубатор SaNyo;
- Холодильник Atlant 5013-016;
- Морозильник;
- Центрифуга лабораторная BioSan с центробежным ускорением 1000-1500g;
- Центрифуга типа Эппендорф MiniSpin;
- Инвертированный микроскоп Nikon E200F;
- Ламинарный шкаф с вертикальной подачей стерильного воздуха БМБ-II- "Ламинар-С.»-1.2 (ЗАО "Ламинарные системы", Россия);
- Пробирки стерильные для сыворотки крови;
- Планшеты стерильные кругло- и плоскодонные 96-луночные Corning, SPL Life Sciences;
- Чашки Петри SPL Life Sciences;
- Пробирки центрифужные, 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.

- Бессывороточная среда (ГибриС-1-II (ПанЭко, Россия); и др.);
- Среда DMEM, DMEM/F12 с глутамином;
- Ростовая добавка BioVer;
- Гентамицин 40 мг/мл;
- Эмбриональная телячья сыворотка (Life Techn., Netherlands и т.п.);
- Вирус везикулярного стоматита с активностью не менее 10⁵ ТЦД/мл (VSV, штамм Индиана) из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, Москва;
- Клетки почки зелёной мартышки Vero из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ, ЦКП "Биобанк" ФГБНУ МГНЦ, Москва.

Анализируемые образцы

Биоматериалом для исследования являются нативные или однократно размороженные после замораживания образцы сыворотки крови. Для проведения исследования в повторах требуется объем сыворотки в 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 10 мин. при центробежном ускорении 1000-1500g. Затем надосадочный вторичный биоматериал (сыворотку крови) в стерильных условиях бокса отбирают в эппендорфы, обращая внимание на его гомогенность. При негомогенности биоматериала центрифугирование следует повторить.

Сыворотку до момента проведения исследования можно хранить в течение недели при 4° С, либо в течение года при температуре не выше минус 20° С.

Размораживать пробирки с замороженной сывороткой необходимо быстро, в воде при температуре 37° С, после размораживания исследование должно быть проведено не позднее чем в течение 2 ч. Повторное замораживание-размораживание образцов сыворотки не допускается. До анализа не допускаются хилёзные и гемолизные пробы сыворотки.

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ нАТ к препарату ИФН с использованием культуры клеток Vero сывороточного и бессывороточного ведения и тест-вируса VSV

1. Подготовка культуры клеток и реагентов

А. Клетки эпителия почечных канальцев зеленой мартышки (Vero) культивируют в условиях 37°С CO₂-инкубатора в среде DMEM 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 использовании клеток эпителия почечных канальцев зеленой мартышки Vero соблюдают те же условия культивирования. При этом 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

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

2). 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 (А) или по 100 мкл DMEM/F12 (Б).

2. Препарат ИФН в рабочей концентрации 2000 МЕ титруют с 2-кратным разведением до 0 МЕ в 2-х рядах лунок круглодонного 96-луночного планшета по 100 мкл на лунку.

3. Далее в 1-й ряд с приготовленными разведениями препарата ИФН вносят по 100 мкл разведенной в 10 раз ЭТС (КО). Во 2й ряд с приготовленными разведениями препарата ИФН вносят исследуемую сыворотку пациента (ИО). Инкубируют планшет 1 ч в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C.

4. Из лунок планшета с монослоем клеток удаляют ростовую среду и переносят в лунки содержимое из круглодонных планшетов по 100 мкл. В свободные лунки вносят по 100 мкл питательной среды без сыворотки и 10-кратно раститровывают тест-вирус 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 (#), 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 10²-10¹ ТЦД₅₀ в 0,1 мл, готовят вирусную суспензию на питательной среде. Содержимое планшетов удаляют и вносят по 100 мкл вирусной суспензии во все лунки, кроме лунок, предназначенных для контроля клеток и для тест-вируса в концентрации 10⁻¹, 10⁻². 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 от действия тест-вируса. Оценку результатов проводят при 100% деструкции монослоя клеток в лунках с контролем вируса. Наличие нАТ определяют по увеличению активности нАТ к препарату ИФН в исследуемом образце сыворотки крови пациента относительно активности контрольного образца.

7. Учет активности нейтрализующих антител в сыворотке крови пациента проводят по их способности блокировать защитное действие тестируемого препарата ИФН на культуре клеток и активность выражают в нейтрализующих единицах (НЕ), где $НЕ\ нАТ = A (ME) \times Z$,

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

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

Таблица 3. Схема расположения КО, ИО, контролей на планшете с монослоем клеток.

A 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
В КО 1000	КО 500	КО 250	КО 125	КО 63	КО 31	КО 16	КО 8	КО 4	КО 2	КО 1	КО 0
С ИО1 1000	ИО1 500	ИО1 250	ИО1 125	ИО1 63	ИО1 31	ИО1 16	ИО1 8	ИО1 4	ИО1 2	ИО1 1	ИО1 0
D KB	KB	KB	KB	KB ⁻¹	KB ⁻¹	KB ⁻²	KB ⁻²	КК	КК	КК	КК
Е ИО2 1000	ИО2 500	ИО2 250	ИО2 125	ИО2 63	ИО2 31	ИО2 16	ИО2 8	ИО2 4	ИО2 2	ИО2 1	ИО2 0
F ИО3 1000	ИО3 500	ИО3 250	ИО3 125	ИО3 63	ИО3 31	ИО3 16	ИО3 8	ИО3 4	ИО3 2	ИО3 1	ИО3 0
G ИО4 1000	ИО4 500	ИО4 250	ИО4 125	ИО4 63	ИО4 31	ИО4 16	ИО4 8	ИО4 4	ИО4 2	ИО4 1	ИО4 0
Н 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Примечание. КК- контроль клеток; KB-контроль вируса; KB⁻¹ и KB⁻² -10- и 100-кратное разведение контроля вируса, соответственно;

КО- контрольный образец «препарат ИФН+ЭТС»; ИО- исследуемый образец «препарат ИФН+сыворотка больного»;

ИО (1-4)- исследуемые образцы сыворотки от 4-х пациентов с используемым ими препаратом ИФН.

В качестве примера предлагается схема титрования препарата ИФН β с исследуемой сывороткой крови пациентов с рассеянным склерозом (таблица 4).

Таблица 4. Схема титрования препарата ИФН β на клетках Vero с исследуемой сывороткой крови пациентов с РС.

№ п/п	Доза препарата ИФН β 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	1000	0	0	0	0
2	500	0	0	0	0
3	250	0	0	0	0
4	125	0	0	0	0
5	63	0	0	0	#
6	31	0	0	0	#
7	16	0	0	0	#
8	8	0	0	+	#
9	4	0	0	#	#
10	2	0	0	#	#
11	1	0	+	#	#
12	0,5	#	#	#	#

Примечание и Интерпретация результатов таблицы.

В лунке 12 контрольного ряда отмечена полная деструкция монослоя клеток (#), что говорит о прекращении защитного действия ИФН.

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

Пациент №2: в сыворотке крови выявлены нАТ к ИФН β в незначительном количестве, входящие в интервал низких значений, составляющие 40 НЕ.

Пациент №3: в сыворотке крови выявлены нАТ к ИФН β в количестве 630 НЕ, способные блокировать 630 экспериментальных МЕ препарата ИФН β . Пациенту рекомендовано повторное исследование сыворотки через 3 месяца на количественное подтверждение нАТ, т.к. полученное из среднего интервала значение нАТ входит в «зону риска».

Расчет результатов

Расчет результата исследования выполняется по формуле $HE_{нАТ} = A (ME) \times Z$, учитывая увеличение активности нАТ к препарату 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 5.

Таблица 5. Референтные значения показателей нАТ к ИФН.

Показатели значений нАТ	Нормальные	Низкие	Средние	Высокие
(HE)	0	0-100	>100-1000	> 1000
		«серая» зона	зона риска	

ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Метод ИФН-нАТ рекомендуется к применению:

а). с целью выявления и количественного определения нейтрализующих антител, блокирующих активность применяемого препарата ИФН и для корректировки проводимой терапии, вплоть до замены препарата, с учетом доказательных мнений клиницистов.

б). в целях недопущения возникновения резистентности к длительно применяемому препарату ИФН и контроля терапии рекомендуется применять метод количественного определения нейтрализующей активности антител к применяемому инъекционному препарату ИФН каждые 3-6 месяцев после начала лечения.

с). обязательное определение нАТ должно выполняться у тех пациентов, у которых отмечается ухудшение течения заболевания во время лечения ИФНβ для определения эффективности ИФНβ терапии.

д). необходимо регулярное мониторинговое количественное содержание уровней нАТ, т.к. титры нАТ важны для оценки биологического ответа на терапию. Пациенты с низким или средним титром, возможно, сохраняют полный или частичный ответ на ИФНβ терапию и могут по-прежнему пользоваться ею. Однако стойкие титры

нАТ указывают на отмену биологического ответа и, следовательно, отсутствие терапевтической эффективности, и это наблюдение должно привести к изменению терапии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ МЕТОДА

Противопоказаний нет.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 ИФН и возможной резистентности к лечению, а также контролировать течение болезни. Ответ на терапию при РС в присутствии нАТ может быть количественно определен биологическим методом (определение ИФН-нАТ) и клиническими маркерами, отображающими клиническое течение заболевания, включающие повторные рецидивы, индекс инвалидизации EDSS, контрастное МРТ для выявления активных очагов поражения мозга.

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, 5, 17, 19].

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.

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

Значение первого положительного результата нАТ+ может быть средним, входить в так называемую зону «риска» ($100 < NE < 1000$). После получение второго результата, подтверждающего наличие нАТ к ИФН, рекомендуются исследования сыворотки пациента на наличие нАТ к ИФН в динамике каждые 3 месяцев в сравнении с клиническим течением заболевания.

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.

На данный момент использование данного метода «ИФН-нАТ» для своевременного выявления и количественного определения нейтрализующих антител к применяемому препарату ИФН, а также контроля резистентности к проводимой терапии препаратом ИФН, соответствует силе рекомендаций «В», «С» (в рамках рандомизированных и нерандомизированных клинических исследований). Уровень доказательности и данные клинических испытаний с оценкой рейтинга исследований приведены в таблице 6.

Таблица 6. Перечень исследований по клинической интерпретации метода нАТ к ИФН.

Год	Автор и место проведения	N	n	Группы	Комментарий	Рейтинг
2012-2015	Проф.Котов, Д-р Оспельникова, Москва	53	35	Здоровые	Здоровые	2+
			18	РС	Мониторинг терапии с определением нАТ	
2013	Д-р Хайбуллин, Д-р Оспельникова Казань, Москва	30	6	Здоровые	Здоровые	1-
			9	РС	Мониторинг терапии с определением нАТ	
			15	РС	Мониторинг терапии для выявления ранних нАТ	
2013-2017	Проф.Котов, Д-р Оспельникова Москва	55	10	Контрольная группа	Больные РС без терапии ИФНβ	2+
			45	РС	Мониторинг терапии с определением нАТ	

N – общее количество обследуемых
n – число обследуемых

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.

Общий алгоритм интерпретации результатов определения нАТ приведен в таблице 7.

Таблица 7. Алгоритм интерпретации результатов метода нАТ к ИФН.

Показатель количественного определения нАТ к ИФН, выраженный в НЕ	Интерпретация результатов анализа	Комментарии
0	нАТ к ИФН в сыворотке крови не выявлены	Норма
1-100 (±)	Низкие значения нАТ к ИФН в сыворотке крови. Для подтверждения положительного результата нАТ рекомендуется повторное исследование через 6 месяцев терапии ИФН	«серая» зона
>100-1000 (+)	Средние значения нАТ к ИФН в сыворотке крови. Для подтверждения положительного результата нАТ рекомендуется повторное исследование через 3, 6 месяцев терапии ИФН	зона «риска»
>1000 (++)	Высокие значения нАТ к ИФН в сыворотке крови. Для подтверждения положительного результата нАТ рекомендуется повторное исследование через 3 месяца терапии ИФН с дальнейшей возможной сменой терапии	зона «риска»

Значение показателя ИФН-нАТ в «серой зоне» ($0 < \text{нАТ (HE)} < 100$) указывает на возможное начало образования интерферон нейтрализующих антител, что требует динамичного клинического наблюдения. В таких случаях показано повторное определение нАТ к ИФН через 6 месяцев.

При обнаружении показателей нАТ в средних ($100 < \text{нАТ(HE)} < 1000$) и, особенно, в высоких ($\text{нАТ (HE)} > 1000$) значениях необходимо повторное, подтверждающее результат, исследование сыворотки на нАТ через 3 месяца.

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

Применение существующей информации о нАТ в клинической практике приведет к повышению эффективности лечения ИФН β для пациентов с РС.

Таким образом, в соответствии с вышеприведенными данными, метод определения ИФН-нАТ позволяет своевременно выявлять эффективность интерферонотерапии, особенно при долговременном применении препаратов ИФН при таких заболеваниях, как гепатиты В и С, рассеянный склероз, папилломатоз, онкологические заболевания и подобные им [10, 11, 21].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Noronha A. Neutralizing antibodies to interferon. *Neurology*. 2007; 68 (12): 16-22.
6. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. М.: Гэотар-Медиа; 2006.
7. Оспельникова Т.П., Носейкина Е.М., Гайдерова Л.А., Ершов Ф.И. Терапевтический потенциал препаратов альфа интерферонов при социально-значимых заболеваниях человека вирусной этиологии. *ЖМЭИ*. 2016, 5: 109-121
8. Talpaz M., Nehlmann R., Quintars-Cardama A., Mercer J., Cortes J. Re-emergence of interferon-a in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013; 27: 803–812.
9. Хабиров Ф.А., Хайбуллин Т.И., Бабичева Н.Н., Аверьянова Л.А., Гранатов Е.В., Оспельникова Т.П. Долгосрочная эффективность и переносимость отечественного биоаналога интерферона бета-1b для лечения рассеянного склероза. *Практическая медицина*. 2013; 1-1 (68): 202-204.
10. Errante PR, Frazgo JB, Condino-Neto A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2008; 3(3):225-30.
11. Key LL, Ries WL, Rodriguiz RM, Hatcher HC. Recombinant human interferon gamma therapy for osteopetrosis. *J. Pediatr.* 1992; 121 (1): 119–24.
12. Akhavan A., Rudikoff D. Atopic dermatitis: systemic immunosuppressive therapy. *Semin Cutan Med Surg.* 2008; 27(2):151-5.
13. Оспельникова Т.П., Егорова О.Н., Балабанова Р.М., Козина В.И., Ершов Ф.И. Интерферон и другие цитокины при ревматических заболеваниях. *Вестник РАМН*. 2010; 7: 3-7.

14. Reljic R. IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. *J Interferon Cytokine Res.* 2007; 27(5):353-64.
15. Lasfar A, Zloza A, Cohen-Solal KA. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. *Drug Discov Today.* 2015 Nov 10. pii: S1359-6446(15)00419-5. doi: 10.1016/j.drudis.2015.10.021.
16. 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.
17. 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.
18. Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н. Рассеянный склероз: руководство для врачей. 2-е изд. М.: МЕДпресс-информ. 2010; 272 с.
19. Sorensen P. S. Neutralizing antibodies against interferon-beta. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 2008; 1: 62-78.
20. 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.
21. Hesse D., Sorensen P.S. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy. *Eur. J. Neurol.* 2007; 14: 850-859.
22. 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.
23. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, Том II. М., 2015. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток.