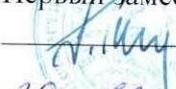


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

 Д.Л. Пиневиц

20.12 2012 г.

Регистрационный № 188-1212

**КОМПЛЕКСНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА С
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр «Мать и дитя»

АВТОРЫ:

к.м.н. Наумчик И.В., к.б.н. Гусина Н.Б., Зиновик А.В.

Минск, 2012

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
20.12.2012
Регистрационный № 188-1212

**КОМПЛЕКСНАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА
С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
“Мать и дитя”»

АВТОРЫ: канд. мед. наук И.В. Наумчик, канд. мед. наук Н.Б. Гусина, А.В. Зиновик

Минск 2012

Наследственные болезни обмена с нейродегенеративными нарушениями (НБО с НД) — гетерогенная группа заболеваний, индивидуальная популяционная частота которых позволяет отнести их в разряд «редких». Нейродегенеративные нарушения характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов, не связанной с непосредственным воздействием внешних факторов. Патоморфологические признаки нейродегенерации — изолированное снижение численности нейронов, принадлежащих к одной или нескольким морфофункциональным группам. Особенностью клинической картины этой группы болезней является наличие периода скрытого развития и прогрессирующее течение с утратой приобретённых навыков.

НБО с НД манифестируют, как правило, в младенческом или детском возрасте. Патогномичные признаки заболевания часто отсутствуют. Дети обычно попадают под наблюдение врача-специалиста в ранней стадии заболевания, когда неврологический дефицит минимален, а прогрессирование заболевания сомнительно. Таким образом, существует проблема выделения группы риска с нейродегенеративными нарушениями из общей группы детей с неврологической патологией и назначения адекватных лабораторных исследований для подтверждения или исключения диагноза. Для решения этой задачи используются результаты мультидисциплинарного медицинского обследования пациентов и данные визуализации головного мозга (магнитно-резонансная томография).

Настоящая инструкция по применению разработана с целью раннего выявления НБО с НД, что позволит выбрать оптимальную тактику ведения пациентов, проводить адекватное медико-генетическое консультирование пробандов и членов семьи, а также пренатальную диагностику в семьях повышенного риска.

Область применения: медицинская генетика, педиатрия, неврология, лабораторная диагностика.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование:

1. Комплект оборудования и реагентов для тандемной масс-спектрометрии (ТМС).
2. Комплект оборудования и реагентов для газовой хроматографии и жидкостной хроматографии высокого разрешения.
3. Комплект оборудования и реагентов для селективного скрининга наследственных болезней обмена веществ с возможностью проведения тонкослойной хроматографии аминокислот, простых и сложных углеводов, двумерного электрофореза гликозаминогликанов.
4. Комплект оборудования и реагентов для иммунофлюориметрии, иммуноферментного анализа (ИФА), иммунотурбодиметрии.
5. Комплект оборудования и реагентов для исследования активности лизосомных ферментов.
6. Комплект оборудования и реагентов для молекулярно-генетических исследований, включая фрагментный анализ, секвенирование.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Неврологическая патология, манифестирующая в младенческом или детском возрасте, характеризующаяся прогрессирующим течением и наличием:

- 1.1. изолированных двигательных нарушений;
- 1.2. сочетанием неврологических и двигательных расстройств.

2. Приобретенная нейросенсорная тугоухость или атрофия зрительного нерва неустановленной этиологии.

3. Признаки дегенеративного поражения центральной нервной системы, обнаруженные при патологоанатомическом исследовании умерших пациентов.

4. Установление статуса носительства заболевания у лиц, имеющих родственников, страдающих НБО с НД.

5. Пренатальная диагностика в семьях с установленным диагнозом НБО с НД.

Перечень заболеваний, манифестирующих в разных возрастных группах, представлен в приложении.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

Метод, изложенный в инструкции по применению, не рекомендуется использовать у пациентов с изолированной задержкой психического развития.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Исследуемый материал

Венозная кровь, образцы капиллярной крови на бумажных бланках, моча, биопсийный материал, образцы тканей *post mortem*.

Алгоритм диагностики НБО с НД

Включает 2 этапа (таблица 1).

Таблица 1 — Схема селективного скрининга на наследственные дефекты метаболизма с ранним поражением центральной нервной системы, манифестирующие нейродегенеративной патологией у детей и молодых взрослых

1 этап (скрининг):

- «рутинная» биохимия сыворотки крови: глюкоза, молочная кислота, пировиноградная кислота, активность трансаминаз, лактатдегидрогеназа, креатинин, мочевины, мочевины, мочевая кислота, холестерин, триглицериды, кальций, магний, фосфор, активность креатинкиназы МВ, ЛДГ, газы крови;

- биохимический скрининг крови и мочи (возможен по сухим пробам, присланным по почте): проба на гипермукополисахаридурию, проба Бенедикта на редуцирующие вещества в моче, проба на кетокислоты, тонкослойная хроматография аминокислот, сахаров крови и мочи, олигосахаридов мочи.

По показаниям определяют:

- церулоплазмин и медь в сыворотке крови, экскрецию меди за 24 ч;
- активность хитотриозидазы в плазме;
- активность арилсульфатазы А в плазме для исключения муколипидозов, CDG-индромов;
- уровень пировиноградной кислоты в сыворотке крови;

- содержание аммиака в сыворотке крови;
- концентрацию фолатов, витамина В₁₂ и гомоцистеина в сыворотке крови.

Проводят нагрузочные тесты с глюкозой при подозрении дефектов митохондриальных карбоксилаз и дегидрогеназ.

Анализируют количество копий митохондриальной ДНК методом REAL-TIME PCR для скрининга на синдромы митохондриальной деплеции и делеций митохондриальной ДНК.

2 этап (верификация диагноза):

- тандемная масс-спектрометрия сухих пятен крови для диагностики нарушений обмена аминокислот, органических кислот, нарушений митохондриального β-окисления жирных кислот, пероксисомных болезней;

- определение наиболее частых мутаций гена SURF 1 для диагностики синдрома Ли;

- выявление наиболее частых мутаций гена POLG для диагностики синдрома митохондриальной деплеции, синдрома Альперса;

- установление активности лизосомных ферментов в лейкоцитах и плазме;

- определение наиболее частых мутаций при лизосомных болезнях;

- выявление сульфатидов в моче для подтверждения диагноза метахроматической лейкоцистозии;

- определение «аллелей псевдодефицита» гена ARSA для дифференциальной диагностики метахроматической лейкоцистозии и других неврологических заболеваний;

- установление мутаций гена ATP 7B для подтверждения диагноза болезни Коновалова–Вильсона;

- ДНК-диагностика митохондриопатий;

- определение активности биотинидазы в пятнах крови;

- изофокусирование трансферина плазмы для диагностики наследственных дефектов гликозилирования.

Первый этап представлен комплексом тестов, позволяющих разбить пациентов на группы и выдвинуть предположительный диагноз.

На основании результатов клинко-инструментального обследования пациент определяется в одну из пяти групп, перечисленных ниже.

Клинко-лабораторные группы НБО с НД:

1. Митохондриальные энцефаломиопатии:

- синдром Кернса–Сейра;

- синдром MELAS;

- синдром MERRF;

- синдром Ли.

2. Пероксисомные заболевания:

- адrenoлейкоцистозия, сцепленная с X-хромосомой;

- болезнь Рефсума;

- нарушения биогенеза пероксисом.

3. Лизосомные заболевания:

- болезнь Сандгоффа;

- болезнь Тея–Сакса;
- болезнь Гоше;
- болезнь Нимана–Пика;
- болезнь Фарбера;
- метахроматическая лейкодистрофия;
- мукополисахаридозы;
- гликопротеинозы.

4. Нарушения метаболизма аминокислот:

- болезнь «кленового сиропа»;
- гомоцистинурия;
- метилмалоновая ацидурия;
- пропионовая ацидурия;
- глутаровая ацидурия I типа.

5. Болезни накопления металлов:

- болезнь Вильсона–Коновалова.

На втором этапе диагноз верифицируется с помощью лабораторных тестов, представленных в таблицах 2–6.

Таблица 2 — Диагностика митохондриальных заболеваний

Заболевание	Маркеры	Дифференциальный диагноз и верификация
Синдром Кернса–Сейра	Лактат; отношение лактат/пируват	Мутация 845delCT в гене SURF1; мутация 1399A>G в гене POLG; мутация m.3243A>G в гене MTTL1 (tRNA ^{Leu}); мутация m.8344A>G в гене MTTK (tRNA ^{Lys}); деплеция и делеция мтДНК
Синдром MELAS		
Синдром MERRF		
Синдром Ли		

Таблица 3 — Диагностика пероксисомных заболеваний

Заболевание	Маркеры	Дифференциальный диагноз и верификация
Адренолейкодистрофия сцепленная с X-хромосомой	C22; C24; C26; C26:1 (ТМС); кортизол, АКТГ (ИФА)	Иммунофлюоресцентная микроскопия пероксисом
Нарушения биогенеза пероксисом		
Болезнь Рефсума	C19ОН; C20ОН (ТМС)	Нет

Таблица 4 — Диагностика лизосомных заболеваний

Заболевание	Маркеры (активность соответствующего фермента в лейкоцитах)	Дифференциальный диагноз и верификация
Болезнь Сандгоффа	β -гексозаминидаза, общая	Нет
Болезнь Тея–Сакса	β -гексозаминидаза, А	Поиск мутаций гена HEXA: 1278insTATC; G269S (805G>A); IVS12+1G>C; R170Q; IVS5-2A>G F304del
Болезнь Гоше	β -глюкозидаза	Поиск мутаций гена GBA: 84CG; IVS2+1; N370S (c.1226A>C); L444P (c.1448T>C); V394L (1297T); D409H
Болезнь Нимана–Пика	сфингомиелиназа	Поиск мутаций гена SMPD1: L302P; fsP330; R496L; Δ R608
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А; тонкослойная хроматография сульфатидов осадка мочи	Поиск мутаций гена ARSA; определение «аллелей псевдодефицита»
Мукополисахаридозы	Концентрация гликозаминогликанов в моче; электрофорез гликозаминогликанов мочи; ферменты обмена гликозаминогликанов	p.R468* гена IDS (МПС I); p.Q70X и p.W402X гена α -L-IDUA (МПС II); p.R152W и p.R160Q гена ARSB (МПС VI)
Гликопротеинозы	Тонкослойная хроматография олигосахаридов мочи; активность специфических ферментов	Нет

Таблица 5 — Диагностика наследственных нарушений метаболизма аминокислот

Заболевание	Маркеры ТМС	Дифференциальный диагноз и верификация
Болезнь «кленового сиропа»	Leu; Val	Нет
Гомоцистинурия	Met	Нсу (ИФА); витамин В ₁₂ (микробиологический тест)
Метилмалоновая ацидурия; пропионовая ацидурия	C3; C4DC; MMA	
Глутаровая ацидурия I типа	C5DC	Поиск мутации с.1204C>T (>40% мутантных аллелей)

Таблица 6 — Диагностика болезней накопления металлов

Заболевание	Маркеры	Верификация
Болезнь Вильсона–Коновалова	Экскреция меди с мочой >0,045 мг/сут	Поиск мутации Н1069Q гена АТР7В (~57% мутантных аллелей)
	Оксидазная активность церулоплазмينا в сыворотке крови 20–90 Ед/л (норма 170–270 Ед/л)	

Для диагностики заболеваний нарушений метаболизма аминокислот исследуют содержание аминокислот и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови методом ТМС. При получении положительного результата необходимо повторное исследование. В случае получения сомнительного результата необходимо неоднократное повторное исследование. В большинстве случаев заключения по результатам ТМС достаточно для установления/исключения диагноза. Дополнительные методы исследования необходимы в случае легкого или средней тяжести течения заболевания, что чаще всего обусловлено сохранением остаточной активности дефектного фермента. Определение содержания гомоцистеина в плазме крови методом ИФА проводится для диагностики гомоцистинурии и комбинированных форм метилмалоновой ацидурии/гомоцистинурии. Молекулярно-генетические исследования обычно предполагают в дальнейшем определение носительства патогенных мутаций у родственников и пренатальную диагностику у выявленных носителей. Маркеры заболеваний и методы верификации перечислены в таблицах 3–6.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Ошибки, связанные с нарушением правил забора, транспортировки, хранения биологического материала и выполнения лабораторных исследований.

Для предупреждения ошибок этой группы необходимо тщательно соблюдать правила работы с биологическим материалом и инструкции по проведению лабораторных исследований.

2. Ошибки, связанные с недостаточной чувствительностью и специфичностью лабораторных тестов:

2.1. Диагностику митохондриальных заболеваний могут осложнять гетероплазмия митохондриальной ДНК и различный порог чувствительности к ней тканей. Поэтому мутации митохондриальной ДНК должны определяться в пораженных тканях. При прижизненном заборе материала у пациентов с комбинированным повреждением нервной и мышечной систем необходима биопсия мышечной ткани, а при патологии нервной системы и печени — биопсия ткани печени. Использование крови для детекции мутаций в митохондриальной ДНК несмотря на высокую специфичность ограничено низкой чувствительностью и значительной вариабельностью гетероплазмии митохондриальной ДНК вследствие высокой скорости обновления кроветворной ткани.

2.2. Ошибки при диагностике НБО с НД методом ТМС могут быть связаны с существованием «мягких» форм заболеваний с атипичным биохимическим фенотипом, влиянием алиментарного фактора и проводимой инфузионной терапии на концентрацию определяемых маркеров. В связи с вышеизложенным целесообразно проводить повторные исследования биохимических показателей в период обострения заболевания;

2.3. Ошибки при диагностике лизосомных болезней могут быть связаны с присутствием аллелей псевдодефицита, дефектами белков-активаторов, а в случае мукополисахаридозов — невысокой экскрецией гликозаминогликанов при легких формах заболевания.

Наследственные дефекты обмена веществ с ранним поражением центральной нервной системы, манифестирующие нейродегенеративной патологией у детей и молодых взрослых

Возраст манифестации	Заболевание
Неонатальный период	<p>Аминоацидопатии: нарушения цикла мочевины, болезнь кленового сиропа, гомоцистинурия</p> <p>Органические ацидурии: пропионовая ацидемия, метилмалоновая ацидемия</p> <p>Лизосомные болезни: GM1-ганглиозидоз, I-cell disease</p> <p>Нарушения биогенеза пероксисом</p> <p>Наследственные дефекты гликозилирования (CDG-синдром)</p> <p>Митохондриопатии</p> <p>Нарушения метаболизма фолатов и кобаламина</p>
Инфантильный период	<p>Аминоацидопатии: нарушения цикла мочевины, болезнь кленового сиропа, гомоцистинурия</p> <p>Органические ацидурии: глутаровая ацидемия I типа, метилмалоновая ацидемия, болезнь Канавана</p> <p>Лизосомные болезни: GM1-ганглиозидоз, I-cell disease, болезнь Гоше II типа, болезнь Нимана–Пика, тип А, болезнь Тея-Сакса, болезнь Краббе</p> <p>Дефекты митохондриального β-окисления</p> <p>Наследственные дефекты гликозилирования (CDG-синдром)</p> <p>Синдром Ли (дефекты цитохромоксидазы митохондрий, обусловленные мутациями гена SURF1, дефекты пируваткарбоксилазы и пируватдегидрогеназы)</p> <p>Митохондриопатии: синдром митохондриальной деплеции, синдром Альперса</p> <p>Нарушения метаболизма фолатов и кобаламина</p> <p>Синдром Леш-Нихана</p> <p>Дефицит биотинидазы</p>
I декада жизни	<p>Лизосомные болезни:</p> <p>Болезнь Гоше, III тип, болезнь Нимана–Пика, тип С</p> <p>Мукополисахаридозы: синдром Гурлер, синдром Хантер, синдром Санфилиппо</p> <p>Муколипидозы III и IV типа</p> <p>Метахроматическая лейкодистрофия</p> <p>Гликопротеинозы: маннозидоз, фукозидоз, болезнь Шиндлера</p> <p>GM1- и GM2-ганглиозидозы (позднеинфантильные и ювенильные формы)</p> <p>Нейрональные цероидные липофусцинозы: инфантильный и позднеинфантильный типы</p>

	<p>Болезнь Вильсона–Коновалова Наследственные дефекты гликозилирования (CDG-синдромы) Синдром Ли Митохондриопатии: синдром митохондриальной деплеции, синдром Альперс, синдром MERRF Органические ацидурии: глутаровая ацидурия Гомоцистинурия X-сцепленная адренолейкодистрофия</p>
<p>Подростковый возраст</p>	<p>Болезнь Вильсона–Коновалова Метахроматическая лейкодистрофия Болезнь Гоше, III тип, болезнь Нимана–Пика, тип C GM1- и GM2-ганглиозидозы (ювенильные формы) Нейрональные цероидные липофусцинозы: ювенильный тип Гомоцистинурия X-сцепленная адренолейкодистрофия Синдром Ли Митохондриопатии: синдром митохондриальной деплеции, синдром Альперс, синдром митохондриальных делеций Кернса–Сейра, синдром MERRF, синдром MELAS Наследственные дефекты гликозилирования (CDG-синдромы)</p>
<p>Взрослые</p>	<p>Болезнь Вильсона–Коновалова Метахроматическая лейкодистрофия Болезнь Нимана–Пика, тип C Нейрональные цероидные липофусцинозы: взрослый тип GM1- и GM2-ганглиозидозы (взрослые формы) Болезнь Гоше I тип с паркинсонизмом Митохондриопатии: синдром митохондриальных делеций Кернса–Сейра, синдром MERRF, синдром MELAS</p>