

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц

\_\_\_\_\_ 2016 г.

Регистрационный номер № 223-1215

МЕТОД КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА  
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»

АВТОРЫ: д.м.н. Докукина Т.В., д.м.н. Полещук Н.Н., к.б.н. Рубаник Л.В.,  
Асташонок А.Н., Пинчук А.С., Королевич П.П., Махров М.В.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

18.03.2016

Регистрационный № 223-1215

**МЕТОД КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья»

АВТОРЫ: д-р мед. наук Т.В. Докукина, д-р мед. наук Н.Н. Полещук, канд. биол. наук Л.В. Рубаник, А.Н. Асташонок, А.С. Пинчук, П.П. Королевич, М.В. Махров

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на верификацию диагноза «болезнь Альцгеймера». Определение маркеров нейродегенерации может найти применение в эпидемиологическом скрининге пациентов с болезнью Альцгеймера, мониторинге прогрессирования когнитивной дисфункции и ответа на патогенетическую терапию.

Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей-неврологов, врачей-вирусологов, врачей лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Шприцы одноразовые стерильные (5 мл) или вакутайнеры на 5 мл для забора крови из вены.

2. Стерильные иглы, стерильные пластиковые или стеклянные пробирки для забора ликвора.

3. Пробирки типа «эппендорф» (объемом 1,5 мл), криопробирки (объемом 2 мл).

4. Прибор для учета и документирования иммуноферментных реакций (ИФА-анализатор).

5. Автоматические пипетки с переменным объемом до 10; 20–200; 100–1000 мкл.

6. Пробирки пластиковые (объемом 10 мл) для приготовления разведений.

7. Холодильник бытовой (+2–8°C) с морозильной камерой (-20°C).

8. Моноклональные антитела к протеазоустойчивому белку PrP<sub>27-30</sub>.

9. Коктейль ингибиторов протеаз (1мМ).

10. ИФА тест-системы для выявления амилоидных белков Aβ40, Aβ42 и фосфорилированной изоформы тау-белка.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Деменция при болезни Альцгеймера (F00.0 — с ранним началом; F00.1 — с поздним началом; F00.2 — атипичного или смешанного типа; F00.9 — неуточненная).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Консультация врача-невролога, врача-психиатра-нарколога.

2. Необходимые обследования:

- целенаправленный сбор анамнеза с вопросами, касающимися памяти, речи, ориентировки, письма, счета и т. д.;

- для исключения возможной соматической патологии (клинический анализ крови; электролиты — Na, K, Cl, Ca, PO<sub>4</sub>; параметры функций почек и печени — креатинин, мочевины, аспаратаминотрансфераза (AsAt), аланинаминотрансфераза

(АлАт); гормоны щитовидной железы — тиротропин, трийодтиронин, тироксин; липидный спектр — определение концентрации холестерина, холестерина липопротеинов высокой плотности, холестерина липопротеинов низкой плотности триацилглицеридов (для исключения сосудистой деменции); определение уровня фолиевой кислоты и витамина В12;

- для исключения инфекционной патологии (анализ крови на ВИЧ-инфекцию, сифилис; бактериологическое исследование ликвора или крови (исключение менингококковой инфекции)).

### 3. Генетическое тестирование.

Может быть выполнено с использованием многочисленных маркеров, многие из которых помогают установить болезнь Альцгеймера с ранним началом. Мутации PS-1, PS-2 и гена амилоидного предшественника ( $\beta$ -APP) на хромосомах 1, 14, 21 соответственно связаны с развитием семейных форм болезни Альцгеймера с ранним началом. Единственным маркером для более частой сенильной формы заболевания является аполипопротеин  $\epsilon$ -аллель, локализованный на хромосоме 19.

### 4. Психометрическое обследование по когнитивным шкалам:

- *тест Фольштейна*. Экспресс-метод исследования психического статуса: общий балл ниже 24 свидетельствует о возможной деменции; при этом общий балл от 18 до 23 указывает на легкие или умеренные нарушения, ниже 17 — на тяжелые;

- *тест рисования часов*. При деменциях лобного типа и деменциях с преимущественным поражением подкорковых структур легкой и умеренной выраженности страдает лишь самостоятельное рисование, в то время как способность расположения стрелок на уже нарисованном циферблате сохраняется. При деменции альцгеймеровского типа нарушается как самостоятельное рисование, так и способность расположения стрелок на уже готовом циферблате);

- *клиническая рейтинговая шкала деменции*. Общая оценка 0 баллов соответствуют норме или легким когнитивным нарушениям, 0,5 балла — умеренным когнитивным нарушениям, 1 балл — легкой деменции, 2 балла — умеренной, 3 балла — тяжелой деменции;

- *батарея тестов для оценки лобной дисфункции*. Общая оценка 16–18 — нормальная; 12–15 — умеренная; менее 12 — выраженная лобная дисфункция. Используется для скрининга деменций с преимущественным поражением лобных долей или подкорковых церебральных структур;

- *ишемическая шкала Хачинского* (оценка свыше 7 баллов предполагает сосудистую причину деменции, 4 и менее баллов — не подтверждает сосудистую этиологию процесса). Помогает дифференцировать мультиинфарктную деменцию от болезни Альцгеймера;

- *монреальская когнитивная шкала*. Оценивает различные когнитивные функции: внимание и концентрацию, исполнительные функции, память, речь, оптико-пространственную деятельность, концептуальное мышление, счет и ориентированность. Обследование пациента при помощи данного подхода занимает приблизительно 10 мин. Максимальное количество баллов — 30; норма — 26 и более;

- *методика Гробера–Бушке* (тест 12 слов). Используется для определения степени когнитивных нарушений и нарушений памяти;

- *тест Струпа*. Методика словесно-цветовой интерференции. Оценка интенсивности и избирательности внимания производится на основании количества прочитанных слов и количества ошибок во время чтения.

5. МРТ/КТ-исследование головного мозга (для исключения патологических состояний — болезнь Пика, лобная дегенерация, болезнь Крейтцфельда–Якоба и т.д.). Диагностическими КТ-маркерами, подтверждающими диагноз деменции альцгеймеровского типа, являются признаки суммарной и региональной атрофии головного мозга, т. е. уменьшение объема вещества головного мозга, о наличии которого судят по индексам, оценивающим степень расширения субарахноидальных пространств и желудочковой системы по отношению к объему мозговой ткани соответствующих долей мозга (объемные индексы), а также по величине линейных желудочковых индексов (передних рогов, центральных отделов, задних рогов и третьего желудочка).

6. Лабораторная диагностика (определение маркеров нейродегенерации — амилоидные белки A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, фосфорилированный тау-белок (p181; p231) в образцах плазмы крови и цереброспинальной жидкости (при возможности ее взятия), детекция аномального протеазоустойчивого белка PrP<sub>27-30</sub>).

Определение аномального протеазоустойчивого белка PrP<sub>27-30</sub> в биологическом материале проводится согласно инструкции по применению «Метод детекции протеазоустойчивого компонента прионного белка PrP<sub>27-30</sub> для дифференциации церебральных амилоидозов инфекционной и неинфекционной природы» (рег. № 240-1213 от 06.03.2014).

6.1. Пробоподготовка биологического материала (кровь, цереброспинальная жидкость).

6.1.1. Взятие крови следует производить натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в вакутайнер. После чего пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. После перемешивания пробирку поместить в штатив. Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10–20 мин при 3000 об./мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Вносят 50 мкл коктейля ингибиторов протеаз, который используется для предотвращения протеолитического расщепления амилоидных пептидов — A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 — в препаратах. Образцы плазмы крови следует разлить небольшими (0,1–0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл типа «эппендорф». Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в криопробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Условия хранения и транспортирования материала: образцы цельной крови могут храниться при температуре 20–25°C в течение 6 ч с момента получения материала; при температуре 2–8°C — не более 1 сут; образцы плазмы крови: при температуре 2–8°C — в течение 5 сут; при температуре -16–20°C — в течение 1 года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортирование пробирок с кровью и микропробирок с плазмой осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в

термосе со льдом при температуре +2–8°C.

Забор крови и ее транспортировка производится согласно руководству «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1–4 групп патогенности» (рег. № 11-7-13-2002 от 30.12.2002).

6.1.2. Цереброспинальную жидкость (ликвор) получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Забор ликвора в количестве не менее 0,5–1 мл проводят в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

Условия хранения и транспортирования материала: при температуре 2–8°C — в течение 1 сут; при температуре -20°C — в течение 1 мес.; при температуре -70°C — длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Транспортирование осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: при температуре 2–8°C в течение 6 ч, в замороженном виде — в течение 1 сут.

6.2. Количественное определение маркеров нейродегенерации Аβ40, Аβ42, тау-белка в биологическом материале методом иммуноферментного анализа.

К патогенетическим изменениям при болезни Альцгеймера относятся нарушение метаболизма белка-предшественника амилоида (APP) и его последующее отложение в виде сенильных бляшек, а также гиперфосфорилирование тау-белка (позиции p181, p231) с последующим образованием нейрофибриллярных сплетений («клубков») в ЦНС. Наибольший диагностический потенциал доказан для трех маркеров: амилоид Аβ40, амилоид Аβ42 и различных эпитопов фосфорилированного тау-белка (таблица).

Уровни фосфорилированного тау-белка, амилоидов Аβ40, Аβ42 отражают ключевые патогенетические признаки болезни Альцгеймера. Определение этих маркеров в спинномозговой жидкости, плазме крови позволяет распознавать нейродегенеративный процесс на ранних стадиях заболевания до развития выраженных когнитивных нарушений, достигающих стадии деменции. На бессимптомной доклинической стадии использование биомаркеров является основополагающим для установления патофизиологических и neuropathological изменений у пациентов с отсутствием симптомов или незначительной их выраженностью. Определение концентраций фосфорилированного тау-белка, амилоидов Аβ40, Аβ42 при умеренных когнитивных нарушениях значительно повышает точность диагностики на ранних стадиях нейродегенеративного процесса и позволяет выявить пациентов, имеющих повышенный риск развития болезни Альцгеймера. При этом, несомненно, сочетание и сопоставление клинических, neuropsychological и biochemical показателей позволит получить наибольшую диагностическую и прогностическую точность обследования.

Организационная схема метода клиничко-лабораторной диагностики болезни Альцгеймера представлена в приложении.

Таблица — Концентрации амилоидных белков Аβ40, Аβ42 и тау-белок в плазме крови и в цереброспинальной жидкости (ликвор) в норме, при умеренных когнитивных нарушениях и болезни Альцгеймера

Показатель	Биологический материал	Умеренные когнитивные нарушения	Болезнь Альцгеймера	Норма
Амилоид Аβ40, пг/мл	Плазма крови	50–58	0–8 уровень Аβ40 ↓ резко снижается	40–50
	Цереброспинальная жидкость	3000–4000 (уровень может не изменяться)	1700–2500	4000–5000
Амилоид Аβ42, пг/мл	Плазма крови	14-18 (но может и не изменяться)	Аβ42↓ (снижается или не определяется вообще)	0–10
	Цереброспинальная жидкость	400–500	200–300	500–600
Тау-белок, пг/мл	Плазма крови	≥30	резко увеличивается ↑ (в 5–10 раз)	0–5
	Цереброспинальная жидкость	60–90	≥150	≤40

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Для обеспечения достоверности результатов образцы следует исследовать в 4-кратной повторности.

Ошибки при оценке результатов детекции биомаркеров (фосфорилированного тау-белка, амилоидов Аβ40, Аβ42) методом иммуноферментного анализа могут быть обусловлены:

- нарушениями технологии на этапе приготовления анализируемых образцов (пробоподготовки), что приводит к получению ложноотрицательных результатов;

- при исследовании плазмы крови методом иммуноферментного анализа необходимо предварительно вносить в исследуемую пробирку специфические ингибиторы протеаз (концентрация 1мМ), препятствующие разрушению биомаркеров (в первую очередь амилоида Аβ42);

- использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся.

### Организационная схема метода клинико-лабораторной диагностики болезни Альцгеймера

