

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



Д.Л.Пиневич

«08»

09

2016г.

Регистрационный № 044-0816

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАССТРОЙСТВ
АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

инструкция по применению

Учреждения - разработчики:

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

Авторы:

д.м.н. Докукина Т.В., к.х.н. Гилеп А.А., к.б.н. Голубева Т.С., к.х.н.
Сергеев Г.В., Марчук С.А., Гайдукевич И.В., Махров М.В.

Минск, 2016

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод оценки риска возникновения расстройств аутистического спектра (РАС). Инструкция предназначена для врачей-психиатров-наркологов, врачей-педиатров, врачей-неврологов (далее – врач-специалист). Изложенный в настоящей инструкции метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику возникновения РАС.

Показания к применению:

Расстройства аутистического спектра (F84).

Противопоказания:

Противопоказания отсутствуют.

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и лекарственных средств

Оценка клиничко-функциональных нарушений осуществляется с помощью прилагаемой шкалы-опросника. Для молекулярно-генетического исследования забор буккального эпителия проводится специальным одноразовым зондом. Для проведения молекулярно – генетического исследования используются три пары праймеров: mt3 sqf1 и mt3 sqr1, mt3 sqf2 и mt3 sqr2 и МТ3F и МТ3R. Продукт полимеразной цепной реакции детектируется с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Необходимы наборы для выделения ПЦР фрагмента из геля и для постановки реакции секвенирования. Постановка сиквенс-реакции осуществляется на амплификаторе. Анализ сиквенс продуктов проводится на генетическом анализаторе.

Методика оценки риска возникновения расстройств аутистического спектра

При обращении к врачу-специалисту детей с РАС и их законных представителей, а при их отсутствии – органа опеки и попечительства (далее – законные представители) с жалобами на нарушение коммуникаций с другими детьми и взрослыми, неадекватное поведение, стереотипное поведение, дезорганизованное поведение, необоснованные страхи, трудности в обучении необходимо провести оценку риска развития аутистического расстройства.

Законные представители ребенка получают инструкции и рекомендации по подготовке к проведению исследования. На каждого ребенка с подозрением на наличие аутистического расстройства оформляется письменное информированное согласие на проведение исследования. Форма «информированное согласие» подтверждает, что законные представители ребенка осведомлены, что генетический материал будет подвергнут всестороннему изучению. На каждого ребенка заполняется регистрационная карта, содержащая идентификационные данные, сведения о патопсихологической наследственности, особенностях течения заболевания,

проводимом ранее лечении, адаптационных особенностях ребенка. Затем врачом-специалистом заполняется шкала клинико-функциональных нарушений при РАС (Таблица 1.). Эта шкала включает 3 основные группы нарушений свойственных расстройствам аутистического спектра: недостаток коммуникации (вербальной и невербальной), недостаток социального взаимодействия и стереотипное поведение. Шкала включает следующие критерии:

1. вербальная коммуникация;
2. невербальная коммуникация;
3. визуальный ответ;
4. слуховой ответ;
5. вкусовые, обонятельные и тактильные ответы;
6. эмоциональный ответ;
7. страхи и тревожность;
8. уровень активности;
9. взаимоотношения с окружающими;
10. стереотипное поведение;
11. наличие психотических симптомов.

При оценке учитывается общее количество баллов в сумме по всем критериям клинико-функционального состояния в соответствии с степенью их выраженности:

- 0 – 6 баллов – отсутствует риск наличия аутистического расстройства;
- 7 – 14 баллов – незначительный риск наличия аутистического расстройства;
- 15 – 21 балл – умеренно выраженный риск наличия аутистического расстройства;
- 22 – 33 баллов – высокий риск наличия аутистического расстройства.

Таблица 1. Шкала клинико-функциональных нарушений при РАС

Признак	Степень выраженности нарушений (Балл)
1. Вербальная коммуникация	
Вербальная коммуникация соответствует возрасту и ситуации	0
Отмечаются незначительное отставание в речевом развитии и некоторые нарушения речи: изредка могут встречаться эхолалия или частичное произношение слова. Случайно могут использоваться особенные слова (неологизмы) или жаргонные слова	1
Отмечаются значительное отставание в речевом развитии: речь либо отсутствует, либо представляет смесь из частично	2

осмысленных и частично особенных слов и звуков (эхолалия, перестановка слогов и др. речевые нарушения)	
Осмысленная речь отсутствует. Могут присутствовать инфантильный визг, крик или звуки, приближенные к речи, или неустойчивое, причудливое использование некоторых узнаваемых слов или фраз	3
2. Невербальная коммуникация	
Использование невербальной коммуникации в соответствии с возрастом	0
Незрелое использование невербальной коммуникации, может только непонятно указывать на предметы	1
Не может выражать свои потребности и желания при помощи жестов и не может понимать невербальное общение других	2
Использует причудливые и странные жесты, которые не имеют очевидного смысла	3
3. Визуальный ответ	
Свободно и достаточно продолжительно поддерживает зрительный контакт.	0
Зрительный контакт поддерживает непродолжительно. Может избегать смотреть людям в глаза	1
Бросает мимолетный взгляд на объект, избегает зрительного контакта с другими людьми, держит предметы близко к глазам	2
Постоянно избегает зрительного контакта с другими людьми	3
4. Слуховой ответ	
Соответствующий возрасту слуховой ответ	0
Реакция на звуки может задерживаться, иногда необходимо повторение звуков, чтобы привлечь внимание ребенка	1
Может иметь место недостаточная реакция или, наоборот, чрезмерная реакция на конкретные звуки; на повседневные громкие звуки вздрагивает или затыкает уши	2
Не реагирует на обращенную речь, часто игнорирует окружающие звуки	3
5. Вкусовые, обонятельные и тактильные ответы	
Вкусовые, обонятельные и тактильные ответы соответствуют возрасту.	0
Иногда может пробовать на вкус или обнюхивать несъедобные предметы, может игнорировать или давать гиперреакцию на легкую боль, которая вызывает у обычного человека лишь дискомфорт	1
Может реагировать либо слишком сильно, либо слишком слабо на болевые раздражители, часто озабочен	2

ощупыванием, обнюхиванием или исследованием на вкус предметов	
Полностью игнорирует боль или реагирует слишком сильно даже на легкий дискомфорт, постоянно озабочен ощупыванием, обнюхиванием или исследованием на вкус предметов (больше для восприятия ощущений, чем для нормального использования предметов)	3
6. Эмоциональный ответ	
Соответствующим образом выражает эмоции, что проявляется в изменении выражения лица, позы, манер	0
Случайно демонстрирует несоответствующие типу и степени эмоциональные реакции. Реакции иногда не соответствуют окружающим его объектам и событиям	1
Показывает явные признаки неадекватного типа и степени эмоционального ответа. Реакции могут быть сдержанными или, наоборот, чрезмерно выразительными и не соответствовать ситуации: может гримасничать, смеяться или становиться апатичным, хотя для этого нет явной причины	2
Реакции редко соответствуют ситуации: находится в неизменном эмоциональном состоянии, повлиять на которое очень сложно. Или может демонстрировать крайне разнообразные эмоции, когда вокруг ничего не изменяется	3
7. Страхи и тревожность	
Поведение соответствует как ситуации, так и возрасту	0
Иногда демонстрирует слишком сильную или слишком слабую реакцию тревоги или страха в сравнении с другими такого же возраста в аналогичной ситуации	1
Часто демонстрирует слишком сильную или слишком слабую реакцию тревоги или страха, даже в сравнении с более младшим возрастом в аналогичной ситуации	2
Чрезмерные страхи (даже на безобидные события) сохраняются длительно. Успокоить очень сложно. Может проявлять интерес к опасностям, которые другие (такого же возраста) избегают.	3
8. Уровень активности	
Уровень активности соответствует нормальному развитию и/или ситуации.	0
Иногда может быть либо беспокойным, либо «ленивым», медлительным и непослушным	1
Часто отказывается выполнять требования взрослых, нужно приложить дополнительные усилия для выполнения заданий (поддается коррекции)	2
Постоянно переходит из одной крайности в другую,	3

демонстрируя пассивность или гиперактивность, которые не поддаются коррекции	
9. Взаимоотношения с окружающими	
Не отмечается сложностей в контакте с другими людьми. Поведение приближено к его возрастной норме.	0
При контакте с окружающими становится суетливым, крайне застенчивым. Отношение к другим не типично для его возраста: может слишком «липнуть» к родителям в сравнении с другими такого же возраста	1
Часто держится в стороне. Временами кажется, что даже не подозревает о присутствии окружающих. Необходимы настойчивые и сильные попытки, чтобы привлечь его внимание	2
Практически никогда не откликается и не идет самостоятельно на контакт с окружающими, упорно уединяется, не интересуется, что делают окружающие. Эффективны только самые настойчивые попытки привлечь его внимание	3
10. Стереотипное поведение	
Отсутствует стереотипность в поведении ребенка	0
Изредка могут присутствовать повторяющиеся движения (в т.ч. и необычные)	1
Часто манера поведения явно странная или необычная, могут быть стереотипные движения пальцами, своеобразие позы, выкручивания пальцев, поглаживание или пощипывание тела	2
Стереотипность в поведении упорно сохраняется, не смотря на попытки ослабить или вовлечь в другую деятельность, может отмечаться аутоагрессия	3
11. Наличие психотической симптоматики	
Отсутствует психотическая симптоматика	0
Периодически могут отмечаться нестойкие психотические симптомы	1
Периодически отмечаются стойкие психотические симптомы	2
Постоянно присутствуют сохраняющиеся психотические симптомы	3

При наличии незначительного, умеренно выраженного или высокого риска наличия аутистического расстройства необходимо провести молекулярно-генетическое исследование на наличие полиморфизма гена МТЗ.

Методика забора буккального эпителия исключает прием пищи в течение 3-х часов. За 1 час до забора биологического материала каждый обследуемый выполняет тщательное полоскание полости рта водой. Забор буккального эпителия производится соскобом клеток с внутренней стороны щеки разовым ватнам зондом. Далее в пробирку помещается рабочая часть зонда. До доставки

в лабораторию материал хранился при температуре -20°C .

Выделяют геномную ДНК из биологического материала (буккальный эпителий). Для проведения молекулярно – генетического исследования сконструированы олигонуклеотидные праймеры для генотипирования.

При разработке праймеров используются последовательность участка 16 хромосомы человека из базы данных NCBI (NC_000016). С целью анализа максимальной длины гена Mt3 и прилегающих к нему 5' и 3' областей, разработаны три пары праймеров: mt3 sqf1 и mt3 sqr1 (2390 bp), mt3 sqf2 и mt3 sqr2 (1147 bp) и MT3F и MT3R (386 bp) (Рисунок 1).

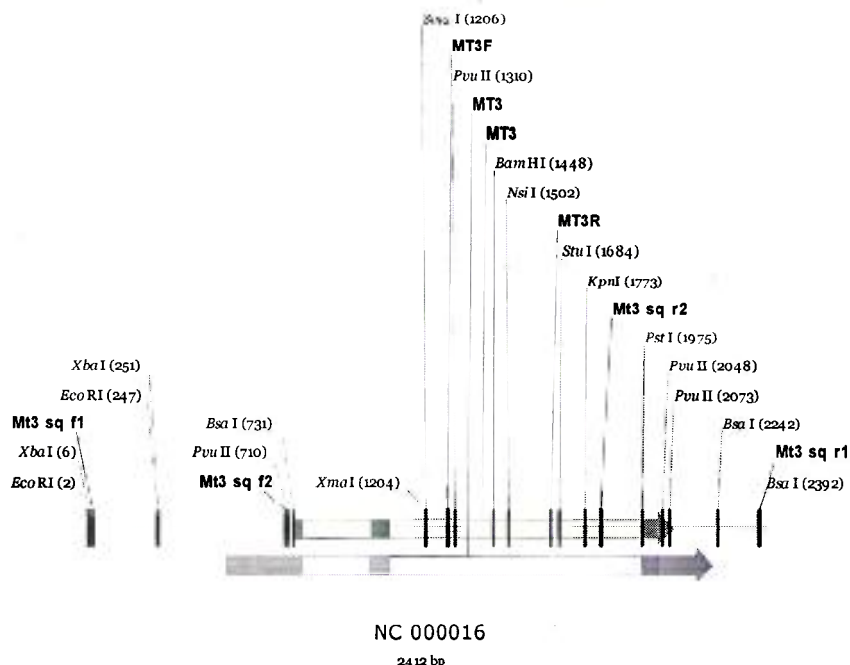


Рисунок 1 - Схематическое отображение последовательности NC_000016 (NCBI), содержащей ген Mt3 и участки связывания разработанных праймеров.

На следующем этапе проводится ПЦР с различными парами праймеров. Анализ ПЦР продуктов с различными парами праймеров и их сочетаниями показывает, что использование праймеров MT3F и mt3 sqr2 дает наибольший по длине продукт (566 bp) с тем условием, что амплификация протекает в большинстве исследуемых образцов.

Для осуществления процедуры секвенирования каждый образец исследуемой геномной ДНК предварительно амплифицируют с использованием MT3F и mt3 sqr2 праймеров, ПЦР продукт детектируется с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, после чего фрагмент вырезается из геля. Выделение ПЦР фрагмента из геля осуществляется с помощью специального набора (Рисунок 2).

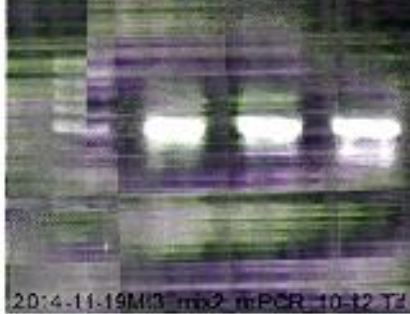


Рисунок 2 - Анализ продуктов амплификации различных образцов геномной ДНК с использованием праймеров МТ3F+sqr2.

Используется набор для постановки реакции секвенирования. На одну реакцию секвенирования количество праймера составляет 3 моль, количество образца ДНК –15 нг для ПЦР продукта. Постановка сиквенса-реакции осуществляется на амплификаторе по рекомендованной производителем программе. Очистка сиквенса-продуктов проводится с использованием специального набора. Анализ сиквенса продуктов проводится на генетическом анализаторе (POP7 полимер, длина капилляра в приборе – 36 см). Для каждого образца проводятся 2 реакции секвенирования, используя прямой и обратный праймеры. Сопоставление полученных сиквенса с референсной последовательностью из базы данных NCBI проводится с использованием специализированной программы.

Анализ получаемых фрагментов методом секвенирования позволяет проанализировать наличие 16 описанных мутаций, среди которых присутствует мутация статистически достоверно связанная с развитием аутизма у детей (rs45570941) (Рисунок 3).

Homo sapiens chromosome 16, GRCh38 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC_000016.10

[GenBank](#) [FASTA](#)

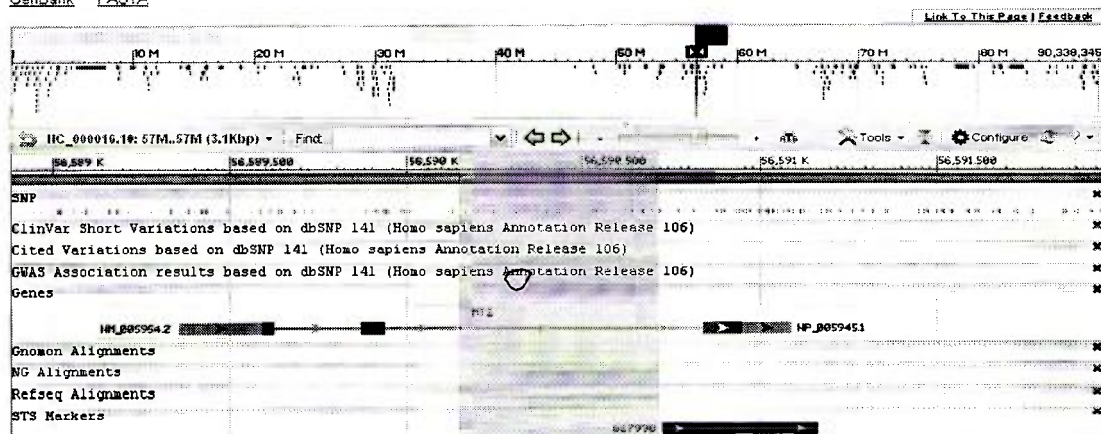


Рисунок 3 - Амплифицируемая область гена Мт3 с использованием праймеров МТ3F и mt3 sqr2. Черным выделена SNP rs45570941.

Дальнейшее определение мутации rs45570941 проводится путем амплификации участка гена МТ-3 с праймерами МТ3F и МТ3R и последующего рестрикционного анализа с использованием BamHI эндонуклеазы. В случае гомозиготы G/G (доминантный тип) на электрофореze присутствуют только полосы длиной 164 и 225 п.н., в случае гетерозиготы G/C – полосы длиной 389, 225 и 164 п.н., а при гомозиготе C/C (рецессивный тип) только полоса длиной 389 п.н.

Выявление мутаций (G/C и C/C генотипы) rs45570941 во втором интроне гена МТ3 указывает на наличие или высокий риск развития аутистических расстройств.

Возможные осложнения при использовании метода

При использовании предложенного метода оценки риска возникновения расстройств аутистического спектра с соблюдением алгоритма выполнения процедуры осложнения отсутствуют.