وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

ادارۀ ژنتیک

دستورالعمل کشوری

تشخیص ناقلین و قبل از

تولد بیماریهای ژنتیک

توجه:

رعایت کلیه موارد ذکر شده دراین برنامه راهبردی برای کلیه آزمایشگاههای عضو شبکه تشخیص پیش از تولد (بیماریهای نام برده شده) الزامی است و در بازدیدهای ادواری کمیته فنی تشخیص پیش از تولد رعایت موارد زیر بر اساس چک لیست ها مورد ارزیآبی و بازدید قرار خواهند گرفت. رعایت موارد مزبور برای آزمایشگاههایی که قصد عضویت در شبکه را دارند و یا در زمینه های ذکر شده فعالیت می کنند توصیه می شود و هنگام بررسی تقاضا درزمان بازدیدها بعنوان امتیاز تلقی خواهد شد.

دستورالعمل کشوری

تشخیص ناقلین و قبل از

تولد هموفیلی A

(بازنگری اسفند 1395)

پذیرش عمومی

در هنگام پذیرش بیمار مخصوصاً زمانیکه از روشهای غیرمستقیم استفاده می شود بیمار هموفیلی A بودن فرد مبتلا باید بدون ابهام محرز شود.

پذیرش بیمار با معرفی پزشک مشاور ژنتیک از مراکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک صورت می گیرد. در صورتی که پذیرش بیمار با معرفی پزشک متخصص صورت گرفت باید فرم ارجاع از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک تکمیل و توسط خانواده به آزمایشگاه تحویل داده شود. در هر صورت کپی کارت بیماری هموفیلی وی باید اخذ شود و در پرونده نگهداری شود (در کارت نوع بیماری و درصد فعالیت فاکتور درج شده است).

۱. تشخیص ناقلین و قبل از تولد هموفیلی A مرحله اول

۱,۱. چنانچه بیش از یک فرد مبتلا در خانواده وجود داشته باشد موارد زیر رعایت شود:

۱,۱,۱. حداقل نمونه خون مادر و فرزند مبتلا اخذ شود و بهتر است خون پدر، خواهر و برادران احتمالی نیز اخذ شود. چنانچه افراد دیگری در خانواده نیاز به آزمایش داشته باشند آزمایشگاه از آنها هم خون دریافت کند.

۱,۱,۲. جهت تشخیص مرحله اول تعیین موتاسیون (روش مستقیم) و مطالعه پیوستگی ژنی از جمله VNTR ، RFLP ، SNP و .... (روش غیرمستقیم) ضروریست.

تبصره ۱ : در روش مستقیم اول موتاسیون فرد مبتلا با روشهای مختلف مانند تعیین توالی صورت می گیرد و یا وارونگی ژنی (Inversion) اینترون های ۲۲ و ۱ مشخص می شود و افراد نامعلوم برای موتاسیون شناخته شده مورد آزمایش قرار گیرند. طبق دستورالعمل تعرفه برای هموفیلی A شدید (کمتر از ۱٪) اول می بایست وارونگی

ژنی (انترون ۱ و ۲۲) بررسی شود و در صورت منفی بودن کل ژن تعیین توالی شود. در صورتیکه بیماری قطعا هموفیلی A باشد و شک به وجود حذف در فرد مبتلا باشد می توان از MLPA و یا روش دیگر حذف ژنی را بررسی شود. در صورتیکه فرد مبتلا فوت کرده باشد با ادله های مختلف نوع روش برای بررسی حذف انتخاب شود.

تبصره۲: در صورت پیدا کردن موتاسیون (تغییر توالی) آزمایشگاه باید ادله کافی برای بیماریزا بودن تغییر مربوطه را ارائه نماید مثلاً از طریق بررسی مقالات ، بررسی بانک اطلاعاتی موتاسیونهای ژن فاکتور هشت انعقادی و یا سایر ادله علمی در صورت نیاز منابع مورد استفاده ذکر شوند.

(http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm).

تبصره ۳ : در روش غیرمستقیم از محلهای چند حالتی یا پلی مرفیکMspI, XbaI, HindIII, BclI, AlwnI وSTR های اینترونهای ۱۳ و ۲۲ و یا STR های داخل یا خارج ژن فاکتور هشت انعقادی استفاده شود وحداقل یک محل گویا داخل ژن و یا دو محل خارج ژن (ترجیحا دو طرف ژن) وجود باشد.

تبصره ۴: چنانچه موتاسیون و یا وارونگی ژنی مشخص نشد از پیوستگی ژنی استفاده شود (باید بیماری قطعا هموفیلیA باشد).

تبصره ۵: چنانچه مهلت کافی برای بررسی موتاسیون (با روش مستقیم) وجود نداشت آزمایشگاه می تواند به روش غیرمستقیم اکتفا نماید ولی باید مسیر تعیین موتاسیون را ادامه دهد (برای بارداری بعدی).

تبصره ۶ :در بررسی غیرمستقیم باید مادر و فرزند بیمار در درجه اول مورد بررسی قرار گیرند. آزمایشگاه مجاز است افراد دیگری از خانواده را مورد بررسی قرار دهد (مثلاً فرزند سالم خانواده، افراد بیمار دیگر در خانواده و ....).

۱،۲. چنانچه فقط یک فرزند مبتلا در خانواده وجود داشته باشد موارد زیر باید رعایت شود.

۱,۲,۱. حداقل خون مادر (یا خانمی که نیاز به تشخیص وضعیت دارد) و فرد مبتلا مورد نیاز است. در صورتیکه آزمایشگاه صلاح بداند می تواند از سایر افراد خانواده خون اخذ کند. از خواهر و برادران احتمالی نیز نمونه اخذ شود و یا هر فردی که نیاز به تعیین وضعیت دارد.

تبصره ۱: در روش مستقیم اول موتاسیون فرد مبتلا با روشهای مختلف مانند تعیین توالی صورت می گیرد و یا وارونگی ژنی (Inversion) اینترون های ۲۲ و ۱ مشخص می شود و افراد نامعلوم برای موتاسیون شناخته شده مورد آزمایش قرار گیرند. طبق دستورالعمل تعرفه برای هموفیلی A شدید (کمتر از ۱٪) اول می بایست وارونگی ژنی (انترون ۱ و ۲۲) بررسی شود و در صورت منفی بودن کل ژن تعیین توالی شود. در صورتیکه بیماری قطعا هموفیلی A باشد و شک به وجود حذف در فرد مبتلا باشد می توان از MLPA و یا روش دیگر حذف ژنی را بررسی شود. در صورتیکه فرد مبتلا فوت کرده باشد با ادله های مختلف نوع روش برای بررسی حذف انتخاب شود.

تبصره۲: چنانچه در خانواده فقط یک فرد مبتلا وجود دارد، موزائیسم گونادی (Gonadal Mosaisism) رد شود. برای این کار در صورت وجود فرد سالم مثلا برادر و یا خواهر، می توان اول با روش هپلوتایپینگ بررسی کرد که آیا آنها واجد هپلوتایپ مشترک با فرد مبتلا هستند یا خیر. در صورت داشتن هپلوتایپ مشترک باید بررسی جهش شودند. اگر فاقد جهش یافت شده بودند، موزائیسم رد می شود. در صورتیکه فرد دیگری وجود نداشته باشد و یا هپلوتایپ مشترک نداشته باشند در گزارش باید ذکر شود که موزائیسم رد نشده است. مشاوره لازم در خصوص موزائیسم به خانواده ارائه شود. استفاده از نمونه خاله فرد مبتلا بی فایده می باشد.

تبصره۳: در روش غیرمستقیم از محلهای چند حالتی یا پلی مرفیکMspI, XbaI, HindIII, BclI, AlwnI وSTR های اینترونهای ۱۳ و ۲۲ و یا STR های داخل یا خارج ژن فاکتور هشت انعقادی استفاده شود وحداقل یک محل گویا داخل ژن و یا دو محل خارج ژن (ترجیحا دو طرف ژن) وجود باشد. در صورتیکه از روش چند حالتی استفاده می شود ارثی بودن بیماری (ناقل بودن مادر فرد مبتلا) باید قطعی باشد در غیر این صورت روش غیر مستقیم نمی تواند به طور مستقل استفاده شود.

تبصره ۴: در صورت پیدا کردن موتاسیون (تغییر توالی) آزمایشگاه باید ادله کافی برای بیماریزا بودن تغییر مربوطه را ارائه نماید مثلاً از طریق بررسی مقالات ، بررسی بانک اطلاعاتی موتاسیونهای ژن فاکتور هشت انعقادی و یا سایر ادله علمی در صورت نیاز منابع مورد استفاده ذکر شوند.

(http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/main.htm) بعد از مشخص شدن موتاسیون در مادر فرد مبتلا، تشخیص باید مانند حالت بند ۱,۱ (مادر قطعاً ناقل است) ادامه پیدا کند.

۱,۳. چنانچه پدر خانواده مبتلا است

۱,۳,۱. در صورتیکه پدر زنده باشد تعیین موتاسیون و روش غیرمستقیم به شرحی که در بند ۱,۱ ذکر شد انجام شود.

۱,۳,۲. چنانچه پدر فوت کرده باشد روش مستقیم و غیرمستقیم (در صورت امکان مثلا استفاده از نمونه عموی مبتلا و یا عموی سالم و یا مادر بزرگ و ...) مانند بند ۱,۱ قابل انجام است.

تبصره: در صورتیکه دیگر افراد خانواده مبتلا باشند بر اساس نیاز و ضرورت افراد خانواده مورد بررسی مولکولی قرار می گیرند.چنانچه توارث بیماری بصورت فامیلی باشد بررسی روش مستقیم و غیرمستقیم و اگر تک موردی باشد روش مستقیم انجام خواهد شد. با توجه به تجربه آزمایشگاه انجام دهنده آزمایشات افراد دیگری از خانواده را ممکن است مورد آزمایش قرار دهد.

۱,۴. چنانچه درصد فاکتور از ۱٪ تا ۵ درصد باشد هموفیلی متوسط گفته می شود. در این حالت ابتدا از روش تعیین توالی استفاده شود. بقیه موارد مانند بالا عمل شود.

۱,۵. با توجه به اینکه برای موارد بالای ۵٪ اجازه سقط شرعی داده نمی شود لذا تعیین موتاسیون و مخصوصا تشخیص قبل از تولد ضرورتی ندارد.

۱,۶. چنانچه جهش قبلا در خانواده مشخص شده باشد، آزمایشگاه می بایست فقط جهش مربوطه را در بقیه افراد خانواده بررسی کند و طبق مقررات جدید نمی تواند هزینه بررسی کل ژن را از خانواده و یا بیمه دریافت کند.

۱,۷. نحوه گزارش دهی مرحله اول:

بعد از انجام آزمایشات فوق آزمایشگاه می بایست گزارش کتبی تهیه و به خانواده، پزشک مراکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره، بیمه و یا هر مرجع ذیصلاح دیگری ارائه دهد.

در گزارش حداقل موارد زیر باید رعایت شود.

۱- شماره پرونده خانواده در آزمایشگاه

۲- نحوه معرفی به آزمایشگاه (چه کسی خانواده را معرفی کرده است).

نام و نام خانوادگی فرد مورد مشاوره و فرد مبتلاییکه مورد آزمایش قرار گرفته (در صورت لزوم نام والدین فرد مبتلا و سایر افراد مورد آزمایش به صلاحدید آزمایشگاه) آورده شود. چنانچه نام فردی آورده می شود می بایست وضعیت مولکولی وی (مستقیم و یا غیرمستقیم) مشخص شود.

۳- تاریخ مراجعه خانواده (اولین بار) (تاریخ مراجعه یعنی تاریخ دریافت نمونه یا نمونه گیری)

۴- محل نمونه گیری یا ارسال نمونه (اختیاری)

۵- تاریخ گزارش نهایی به خانواده، پزشک و .....

۶- روش آزمایش بکار رفته برای تشخیص (مستقیم، غیر مستقیم) و نوع موتاسیون و نتیجه روش غیر مستقیم مشخص شود.

تبصره۱: در هر صورت در گزارش فارسی یا انگلیسی می بایست نام موتاسیون و نتیجه بررسی غیر مستقیم (اگر انجام شده باشد) ذکر شود.

۷- نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند مبتلا یا سالم)

۸- در متن فارسی باید به پزشک یا خانواده و ..... اطلاع داده شود که چکار باید بکنند.

۹- هر گزارش باید جملاتی در خصوص احتمال خطا (disclaimer) داشته باشد (ضمیمه)

۱۰- آدرس و مشخصات آزمایشگاه

۱۱- نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی باشد.

۲. مرحله دوم تشخیص قبل از تولد هموفیلی A (تعیین جنسیت جنین)

بعد از انجام مرحله اول قبل از بارداری و یا هنگام بارداری مراحل زیر به ترتیب و در صورت نیاز (مرحله سوم) باید انجام شوند.

۲,۱. برای تعیین جنسیت جنین باید کنترلهای لازم نمونه مرد و زن همراه نمونه جنینی مورد تعیین جنسیت قرار گیرند و آزمایش تعیین جنسیت حداقل ۲ بار تکرار شود (همزمان یا در دو نوبت).

۲,۲. چنانچه جنین دختر باشد و در صورتیکه نتیجه روش غیرمستقیم جنینی و مادر یکسان باشد تعیین هویت انجام گیرد. استفاده از VNTR و یا STR های متصل به ژن می تواند کمک کننده باشد. در هر صورت رفع شبه آلودگی نمونه جنین با مادر صورت گیرد.

تبصره: تعیین هویت مولکولی بطور کلی برای کلیه نمونه های جنینی توصیه می شود که استفاده از STR های متصل به ژن می تواند این منظور را محقق کند.

۲,۳.بعد از انجام آزمایشات فوق آزمایشگاه می بایست گزارش کتبی تهیه و به خانواده، پزشک مراکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره، بیمه و یا هر مرجع دیگری ارائه دهد.

۲,۴. در گزارش مرحله دوم موارد زیر باید آورده شود.

۱. شماره پرونده خانواده در آزمایشگاه
۲. نحوه معرفی به آزمایشگاه (چه کسی خانواده را معرفی کرده است).
۳. نام و نام خانوادگی فرد مورد مشاوره و فرد مبتلاییکه مورد آزمایش قرار گرفته (در صورت لزوم نام والدین فرد مبتلا و سایر افراد مورد آزمایش به صلاحدید آزمایشگاه) آورده شود. چنانچه نام فردی آورده می شود می بایست وضعیت مولکولی (مستقیم و یا غیرمستقیم) وی مشخص شود.
۴. تاریخ مراجعه خانواده (اولین بار) (تاریخ مراجعه یعنی تاریخ دریافت نمونه یا نمونه گیری)
۵. محل نمونه گیری یا ارسال نمونه (اختیاری)

۶. تاریخ گزارش نهایی به خانواده، پزشک و .....

۷. وضعیت جنین و در صورتیکه تعیین هویت صورت گرفته شده باشد ذکر شود.

۸. روش آزمایش بکار رفته برای تشخیص (تعیین جنسیت با استفاده از ژن Amelogenin صورت می گیرد).

۹. نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند مبتلا یا سالم)

۱۰. هر گزارش باید جملاتی در خصوص احتمال خطا (disclaimer) داشته باشد (ضمیمه)

۱۱. آدرس و مشخصات آزمایشگاه

۱۲. نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی باشد.

۳. مرحله سوم تشخیص قبل از تولد هموفیلی A:

چنانچه مادر قطعاً ناقل هموفیلی A تشخیص داده شده باشد و تشخیص مرحله دوم انجام گرفته شده باشد و جنین پسر باشد تشخیص قبل از تولد مرحله سوم انجام می شود.

۳,۱. تشخیص بر روی نمونه جنین همراه کنترلها و نمونه فرد مبتلا و مادر وی و هر فرد دیگری که به نتیجه گیری کمک می کند باید انجام شود.

۳,۲.جنین برای موتاسیون شناخته شده بررسی شود.

۳,۳.جنین برای چندحالتی گویا همراه افراد دیگر (بند ۱) مورد ارزیابی قرار گیرد.

۳,۴.در هر صورت رفع شبه و اصالت نمونه جنینی انجام شود.

۳,۵.نحوه گزارش دهی مرحله سوم

در گزارش موارد زیر باید آورده شود:

۱. شماره پرونده خانواده در آزمایشگاه

۲. نحوه معرفی به آزمایشگاه (چه کسی خانواده را معرفی کرده است)

۳. نام و نام خانوادگی فرد مورد مشاوره و فرد مبتلاییکه مورد آزمایش قرار گرفته (در صورت لزوم نام والدین فرد مبتلا و سایر افراد مورد آزمایش به صلاحدید آزمایشگاه) آورده شود. چنانچه نام فردی آورده می شود می بایست وضعیت مولکولی (مستقیم و یا غیرمستقیم) مشخص شود.

۴. باید در گزارش زمان مراجعه، سن بارداری زمان مراجعه، زمان نمونه گیری از جنین، زمان اعلام نتیجه نهایی در گزارش آورده شود

۵. تاریخ مراجعه خانواده (اولین بار) (تاریخ مراجعه یعنی تاریخ دریافت نمونه یا نمونه گیری)

۶. محل نمونه گیری یا ارسال نمونه (اختیاری)

۷. تاریخ گزارش نهایی به خانواده، پزشک و ....

۸. روش آزمایش بکار رفته برای تشخیص (مستقیم، غیر مستقیم، نوع موتاسیون و نتیجه روش غیر مستقیم مشخص باشد)

۹. روش یا روشهای تشخیص مولکولی (مثلاً مستقیم، غیرمستقیم یا هر دو)

۱۰. نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند)

۱۱. تبصره: در هر صورت در گزارش فارسی یا انگلیسی می بایست نام موتاسیون و نتیجه بررسی غیر مستقیم (اگر انجام شده باشد) ذکر شود.

۱۲. در متن فارسی باید به پزشک یا خانواده و ..... اطلاع داده شود که چکار باید بکنند.

۱۳. هر گزارش باید جملاتی در خصوص احتمال خطا (disclaimer) داشته باشد (ضمیمه)

۱۴. آدرس و مشخصات آزمایشگاه

۱۵. نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی باشد.

۴. مرحله اول و دوم و سوم تشخیص قبل از تولد هموفیلی A (مواردیکه بیش از یک فرد مبتلا در خانواده وجود دارد یا پدر مبتلا است).

هرگاه خانمی که قطعاً ناقل است و برای مرحله اول تا سوم هموفیلی A مراجعه کرده است موارد زیر باید رعایت شود.

۴,۱. در صورت وجود وقت کافی تعیین موتاسیون با شرایطی که در مرحله اول گفته شد انجام می گیرد.

۴,۲. در صورتیکه زمان کافی وجود نداشت و آزمایشگاه از روش غیر مستقیم استفاده می کند، ناقل قطعی بودن خانم باید محرز باشد و اگر چنین نبود (در موارد تک موردی)، شرایط و احتمال ناقل نبودن خانم به وی گفته شود و برای تشخیص برروی نمونه جنینی رضایت خاص گرفته شود. البته مراحل انجام آزمایش مثل مرحله دوم و یا دوم و سوم می باشد.

۴,۳. تشخیص به روش غیرمستقیم در هر صورت باید انجام شود و اگر محل گویا وجود نداشت اول تعیین جنسیت و اگر جنین پسر بود روش مستقیم انجام شود. (در صورتیکه در زمان مراجعه جنین ۱۰ هفته یا بیشتر سن داشته باشد) تعیین جنسیت در اولویت است ولی روشهای دیگر باید ادامه پیدا کند(برای مرحله احتمالی سوم یا بارداریهای بعدی). در صورتیکه جنین دختر بود مانند مرحله دوم عمل شود.

۴,۴. در صورتیکه پسر بود مانند مرحله سوم عمل شود.

۴,۵.نحوه گزارش اول و دوم و یا اول تا سوم

در گزارش موارد زیر باید آورده شود:

۱. شماره پرونده خانواده در آزمایشگاه
۲. نحوه معرفی به آزمایشگاه (چه کسی خانواده را معرفی کرده است)
۳. نام و نام خانوادگی فرد مورد مشاوره و فرد مبتلاییکه مورد آزمایش قرار گرفته (در صورت لزوم نام والدین فرد مبتلا و سایر افراد مورد آزمایش به صلاحدید آزمایشگاه) آورده شود. چنانچه نام فردی آورده می شود می بایست وضعیت مولکولی (مستقیم و یا غیرمستقیم) وی مشخص شود.
۴. تاریخ مراجعه خانواده (اولین بار) (تاریخ مراجعه یعنی تاریخ دریافت نمونه یا نمونه گیری)
۵. محل نمونه گیری یا ارسال نمونه (اختیاری)

۶. تاریخ گزارش نهایی به خانواده، پزشک و .....

۷. روش آزمایش بکار رفته برای تشخیص (مستقیم، غیر مستقیم، نوع موتاسیون و نتیجه روش غیر مستقیم مشخص باشد .

۸. چنانچه جنین دختر بود مانند مرحله دوم ذکر شود و اگر پسر بود وضعیت وی مشخص شود.

۹. نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند)

تبصره: در هر صورت در گزارش فارسی یا انگلیسی می بایست نام موتاسیون و نتیجه بررسی غیر مستقیم اگر انجام شده باشد ذکر شود.

۱۰. در متن فارسی باید به پزشک یا خانواده و ..... اطلاع داده شود که چکار باید بکنند.

۱۱. هر گزارش باید جملاتی در خصوص احتمال خطا (disclaimer) داشته باشد (ضمیمه)

۱۲. آدرس و مشخصات آزمایشگاه

۱۳. نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی باشد.

It is of outmost importance for all clinicians involved in the care of families requesting prenatal diagnosis, in DNA analysis. Incorrect diagnosis may **risk of errors** and the families themselves to be aware of the result from (1) Incorrect hematological data and clinical diagnosis for thalassemia (2) Incomplete family (4)Paternity studies and history (3) Mix-up of DNA or blood samples both in transportation or in the lab problems, adoptions, IVF (5) Maternal contamination of CVS (6) Rare molecular events (7) New or spontaneous mutations (8) Technical errors.
of error from DNA recombination in diagnosis by polymorphism is approximately 0.3%. The risk The risk of error from the various reasons mentioned above and several other factors is approximately 0.5% whereas the chances of technical error of all types of DNA analysis are estimated to be 0.5%.

We at Medical Genetics Laboratory of Dr. routinely perform both direct mutation analysis and RFLP. We also apply other QC to reduce the risk of errors to the minimum. Any feedback from our colleagues in the clinical field would be most welcomed. Comments can be given either in written form or calling us at the numbers given below or by E.mail: info@medicalgeneticslab.ir