دستورالعمل کشوری

تشخیص ناقلین و قبل از

تولد نقص BH4 (OMIM; #261630, Hyperpheneylalanemia, BH4-deficient, HPABH4C)

(بازنگری اسفند ۱۳۹۵)

پذیرش عمومی:

پذیرش بیمار با معرفی پزشک مشاوره ژنتیک از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک صورت می گیرد. در صورتی که پذیرش بیمار با معرفی پزشک متخصص صورت گرفته است، باید فرم PND (شماره ۳) از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک تکمیل و توسط خانواده به آزمایشگاه تحویل داده شود.

۱. تشخیص قبل از تولد نقص BH4 (مرحله اول)

۱,۱. بیمار به همراه نتایج بررسی بیوشیمیایی پذیرش می شود. نتایج آزمایشها می بایست پی کی یو بودن بیمار را تایید نماید. جهت شروع آزمایشات نمونه خون از افراد زیر گرفته شود: فرد مبتلا، پدر و مادر فرد مبتلا، حداقل یک فرزند سالم خانواده در صورت وجود و افراد ناقل احتمالی (مشکوک).

۱,۲. در صورتیکه آزمایش PND برای همان خانواده انجام نمی شود بر حسب ضرورت از بستگان خانواده خون گرفته شود.

تبصره: در صورتیکه یکی از بستگان فرد مبتلا متقاضی انجام تست نقص BH4 می باشد، ابتدا می بایست ژن درگیر و جهش در فرد مبتلا دقیقا مشخص و بعد فرد یا افراد مشکوک تعیین موتاسیون شوند حتی اگر این فرد خواهر و یا برادر فرد مبتلا باشد. در صورت فوت فرد مبتلا این عمل اول در والدین فرد مبتلا انجام شود. استفاده از روشهای غیر مستقیم می تواند به عنوان روشی برای شناسایی ژن درگیر و در صورت تایید درگیری ژن خاص برای تعیین ناقلین و تشخیص قبل از تولد استفاده شود (به همراه روش مستقیم).

۱,۳. تشخیص ناقلین و قبل از تولد نقص BH4 با استفاده از روشهای زیر صورت می گیرد:

تحقیقات در کشور نشان داده است که حدود ۳-۵ درصد بیمارانی که به عنوان بیمار مبتلا به پی کی یو به آزمایشگاه های ژنتیک معرفی می شوند در واقع واجد نقص BH4 هستند. با توجه به اینکه امروزه بیماران تحت کنترل تغذیه و درمان هستند تشخیص نوع کلاسیک از نوع BH4 با تعیین مقدار فنیل الانین به راحتی امکان پذیر نمی باشد. در این موارد اول ژن PAH باید بررسی شود. آزمایشگاه می تواند قبل از بررسی با روش هموزیگوسیتی وجود هپلوتیپ هموزیگوت در فرد مبتلا را بررسی کند (در صورتیکه والدین ازدواج فامیلی داشته باشند این روش کم هزینه تر از تعیین توالی خواهد بود). چنانچه آزمایشگاه بعد از بررسی ژن PAH و عدم پیدا کردن جهش و یا عدم درگیری این ژن و یا ادله دیگر مثلا نتیجه آزمایش بیوپترین و نئوپترین(Biopterin and Neopterin) در فرد مبتلا، به نقص BH4 پی ببرد می بایست ژنهای عامل ایجاد نقص در تولید BH4 را بررسی کند. مطالعات نشان می دهد در اکثر موارد یکی از ژنهای QDPR (۷ اگزون) و یا PTS (۶ اگزون) درگیر هستند. چنانچه بیماری قطعا نقص BH4 بود و این دو ژن درگیر نبودند سه ژن دیگر می توانند درگیر باشند. ژنهای GCH1 (۶ اگزون) و PCBD1 (۴ اگزون) و SPR (۳ اگزون) با درصد کمی عامل این بیماری می باشند. از آنجا که این ژنها دارای اگزونهای کمی هستند می توان آنها را مستقیم تعیین توالی کرد (ژن SPR بسیار نادرتر از بقیه موارد نادر می باشد و فقط در صورت دیدن هموزیگوسیتی ارزش بررسی دارد). چنانچه آزمایشگاه به نقص BH4 شک دارد و نیز کودک مبتلا در قید حیات است بهتر است خانواده جهت بررسی مقدارBiopteri and Neopterin به بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران اعزام شود و بعد از اطلاع از مقدار این دو پروتئین تصمیم گرفته شود که کدام

از ژنها بررسی شود (در آزمایش بیوشیمایی معمولا با دقت بالا مشخص می شود که کدام دو ژن QDPR و PTS درگیر هستند). چنانچه بررسی بیوپترین و نئوپترین مقدور نباشد (به هر دلیل مانند فوت فرد مبتلا و یا عدم همکاری خانواده) یا باید کل ژنها با اولویت ژنهای QDPR و PTS بررسی شوند و از روشهای دیگر مانند اتصال ژنی استفاده شود. در صورت عدم دریگری این دو ژن می توان ژنهای دیگر عامل BH4 را بررسی کرد.

چنانچه فرد مبتلا فوت کرده باشد آزمایشگاه می تواند از طریق هپلوتایپینگ، بررسی کند که آیا والدین دارای هپلوتیپ مشترک هستند یا خیر. به دلیل نادر بودن BH4 احتمال واجد هپلوتیپ مشترک در والدین بیشتر است. در صورت شک به درگیری ژنهای QDPR و PTS آزمایشگاه می تواند اول جهشهای شایع گزارش شده در دو مقاله زیر را بررسی کند ولی به دلیل کوچکی این دو ژن می توان مستقیما از تعیین توالی ژن QDPR و اگر جهشی یافت نشد ژن PTS استفاده شود. آزمایشگاه می بایست با ادله کافی بیماری زا بودن جهش یافت شده را اثبات کند مثلا از طریق سایت www.biopku.org.

Molecular Characterization of* QDPR *Gene in Iranian Families with BH4 Deficiency: Reporting Novel and Recurrent Mutations. Foroozani H. et al., JIMD Rep. 2015; 21: 123–128.

Four Years of Diagnostic Challenges with Tetrahydrobiopterin Deficiencies in Iranian Patients. Khatami S. et al., JIMD Rep.

گزارش مرحله اول مانند بیماری PKU کلاسیک می باشد.

گزارش مرحله اول نقص BH4:

(نحوه گزارش بر اساس دستورالعمل عمومی گزارش مرحله اول و یا اول و دوم و یا دوم خواهد بود)

بعد از انجام آزمایشات فوق آزمایشگاه می بایست جواب آزمایش ژنتیک تهیه کند و به خانواده، پزشک، مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک و یا در صورت درخواست قانونی به مراجع ذیصلاح ارائه دهد.

گزارش مرحله اول باید شامل موارد زیر باشد.

۱- نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند)

۲- شماره پرونده

۳- نحوه معرفی به آزمایشگاه (چه کسی خانواده را معرفی کرده است)
۴- آدرس و مشخصات آزمایشگاه (گزارش در سربرگ آزمایشگاه نوشته شود)
۵- تاریخ اولین مراجعه خانواده (تاریخ دریافت نمونه یا نمونه گیری درج شود)
۶- محل نمونه گیری یا ارسال نمونه
۷- تاریخ گزارش نهایی
۸- روش یا روشهای تشخیص مولکولی استفاده شده بر اساس دستورالعمل
۹- نتیجه بررسی روشهای مولکولی به طور دقیق اعلام شود (مثلا استفاده از روش غیر مستقیم مثلاً STR و یا هپلوتایپ با کمک STR ها و .....، روش مستقیم با روش ARMS و یا تعیین توالی و جهش پیدا شده در فرد مبتلا و خانواده)

تبصره: در هر صورت در گزارش فارسی یا انگلیسی می بایست نام روش غیرمستقیم و نیز روش مستقیم ذکر شود.

۱۰- در متن فارسی امکان یا عدم امکان تشخیص قبل از تولد (و یا عدم نیاز) و زمان مراجعه باید ذکر شود.
۱۱- هر گزارش باید جملاتی در خصوص احتمال خطا (disclaimer) داشته باشد (ضمیمه)
۱۲- نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی .

۲. تشخیص قبل از تولد نقص BH4 (مرحله دوم)

مرحله دوم برای کسانی است که مرحله اول را قبل از بارداری و یا در قبل از هفته دهم بارداری انجام داده اند و جهش یا جهش ها مشخص شده باشد و یا چند حالتیهای گویا تایید شده باشند.

۲,۱. نمونه جنینی می بایست به همراه DNA والدین برای تعیین موتاسیون و روش غیرمستقیم (به شرحی که در مرحله اول PND ذکر شده) مورد آزمایش قرار گیرند. نمونه جنینی برای موتاسیون والدین می بایست حداقل ۲ بار مورد آزمایش قرار گیرد. استفاده از نمونه های مشخص شده قبلی (کنترلها) در هر مورد ضروری است.

۲,۲. چنانچه در زمان نمونه گیری از جنین، سن جنین بیش از ۱۴ هفته باشد، توصیه می شود که نمونه جنینی جهت تعیین موتاسیون مورد بررسی قرار گیرد. در صورتی که تعیین وضعیت جنین تنها با یک روش (مستقیم یا غیرمستقیم، به دلیل کمبود وقت یا مشخص نبودن جهش یا نداشتن جایگاه گویا در خانواده) انجام می گیرد، آزمایشات لازم بر روی نمونه جنینی می بایست حداقل ۲ بار تکرار شوند. توصیه می شود

آزمایشگاه بررسی های خود را جهت تکمیل ژنوتیپ یا هاپلوتیپ، برای بارداریهای احتمالی بعدی انجام دهد.

تبصره۱- چنانچه در بررسی مرحله دوم یا اول و دوم موتاسیون در یکی یا هر دو والد مشخص نباشد و فرصت بررسی دقیق مانند تعیین توالی وجود نداشت و یا به نتیجه نرسید تشخیص قبل از تولد با استفاده از روش غیرمستقیم مجاز می باشد، مشروط بر اینکه برای آزمایشگاه محرز باشد که فرد مبتلا واجد نقص BH4 می باشد. وگرنه باید اول جهش مشخص شود و یا با روش Linkage درگیر بودن ژن مورد بررسی (مثلا QDPR) محرز شود.

تبصره 2- چنانچه آزمایشگاه محیطی در مرحله اول و دوم و یا دوم ظرف دو هفته نتوانست به نتیجه برسد ضمن ادامه آزمایشات می بایست نمونه والدین و جنینی و ..... را طی نامه رسمی به همراه نتایج آزمایشات بیوشیمیائی و نتایج بررسیهای مولکولی به عمل آمده را به آزمایشگاه مرجع ارسال دارد (در صورت نبودن آزمایشگاه مرجع، نمونه را می توان به آزمایشگاه منتخب معرفی شده ارسال شود). آزمایشگاه مرجع ظرف حداکثر یک هفته می بایست امکان یا عدم امکان تشخیص را کتباً به آزمایشگاه محیطی اعلام نماید (آزمایشگاه مرجع در صورت نیاز می تواند از خدمات آزمایشگاه منتخب با تجربه استفاده نماید) .

تبصره ۳–چنانچه با فرض تبصره ۲ (بالا) آزمایشگاه مرجع نتواند به موقع وضعیت جنین را مشخص کند گزارش به همراه دلیل عدم تشخیص قطعی و احتمال خطر ظرف یک هفته به خانواده و مرکز بهداشت مربوطه داده شود.

نحوه گزارش مرحله دوم نقص BH4

(نحوه گزارش بر اساس دستورالعمل عمومی گزارش مرحله اول و یا اول و دوم و یا دوم خواهد بود)

گزارش مرحله اول باید شامل موارد زیر باشد.

۱- نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند)
۲- شماره پرونده
۳- نحوه معرفی به آزمایشگاه (چه کسی خانواده را معرفی کرده است)

۴- تاریخ مراجعه خانواده (مرحله دوم و یا اول و دوم) مشخص شود.
۵- محل نمونه گیری از والدین و یا ارسال نمونه
۶- نوع نمونه جنینی و پزشک نمونه گیر
۷- آدرس و مشخصات آزمایشگاه (گزارش در سربرگ آزمایشگاه نوشته شود)
۸- تاریخ و سن جنین در هنگام نمونه برداری
۹- تاریخ صدور گزارش
۱۰ نتیجه روش غیرمستقیم والدین (فرزند مبتلا یا ناقل) و جنین
۱۱ نتیجه موتاسیون والدین (فرزند مبتلا یا ناقل) و جنین.
۱۲- نتیجه بررسی روشهای مولکولی به طور دقیق اعلام شود (مثلا استفاده از روش غیر مستقیم مثلاً STR و یا هپلوتایپ با کمک STR ها و .....، روش مستقیم با روش ARMS و یا تعیین توالی و جهش پیدا شده در فرد مبتلا و خانواده)

تبصره: در هر صورت در گزارش فارسی یا انگلیسی می بایست نام روش غیرمستقیم با ذکر گویایی و یا غیر گویا بودن و نیز روش مستقیم ذکر شود.

۱۳-نتیجه گیری نهایی وضعیت جنین و توضیح اینکه سالم، مبتلا یا ناقل است.
۱۴- Disclaimer (ذکر احتمال خطا)
۱۵-نام و نام خانوادگی، امضاء و مهر مسئول فنی

It is of outmost importance for all clinicians involved in the care of families requesting prenatal diagnosis, and the families themselves to be aware of the risk of errors in DNA analysis. Incorrect diagnosis may result from (1) Incorrect hematological data and clinical diagnosis for thalassemia (2) Incomplete family studies and history (3) Mix-up of DNA or blood samples both in transportation or in the lab (4)Paternity problems, adoptions, IVF (5) Maternal contamination of CVS (6) Rare molecular events (7) New or spontaneous mutations (8) Technical errors.

The risk of error from DNA recombination in diagnosis by polymorphism is approximately 0.3%. 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

۳. تشخیص قبل از تولد مرحله اول و دوم نقص BH4

چنانچه در هنگام اولین مراجعه خانواده به مرکز PND خانم باردار باشد (معمولا از طریق سونوگرافی مشخص می شود و بعد از هفته هفتم می باشد) مرحله اول و دوم تواماً بر اساس پروتکلهای تدوین شده مرحله اول و یا اول و دوم انجام خواهد شد.

تبصره: استفاده از روشهای غیر مستقیم به همراه مستقیم ضروری می باشد. چنانچه استفاده از روشهای غیر مستقیم مبنای تصمیم گیر ی می باشد، نقص BH4 و ژن درگیر (مثلا از طریق همزیگوسیتی و یا هپلوتایپینگ) باید محرز باشد.

گزارش مرحله اول و دوم نقص BH4

بعد از انجام آزمایشهای ذکر شده (بر اساس پروتکل تدوین شده) آزمایشگاه می بایست گزارش کتبی تهیه کرده و به خانواده، پزشک مرکز بهداشتی، درمانی ویژه مشاوره ژنتیک و یا در صورت درخواست قانونی به مراجع ذیصلاح ارائه دهد.

نحوه ارئه گزارش مانند مرحله دوم خواهد بود.

نحوه برخورد با خانمهای باردار در مرحله دوم و نمونه جنینی

۱. بهتر است قبل از اعزام خانواده برای مرحله دوم، سن بارداری قبلا مشخص شده باشد (مثلا با انجام سونوگرافی). اعزام خانواده برای نمونه جنینی با هماهنگی آزمایشگاه صورت گیرد و برای اعزام خانواده جهت نمونه گیری از جنین (مثلا CVS) لازم است سن بارداری بعد از هفته دهم بارداری باشد (تایید شده از طریق سونوگرافی). توصیه می شود گروه خونی مادر مشخص شود. اگر مادر واجد Rh منفی بود لازم است به طرق مقتضی پزشک نمونه گیر از آن مطلع شود. چنانچه خانواده به موقع مراجعه کرده باشد ترجیحا نمونه گیری بین هفته ۱۱-۱۲ صورت گیرد مگر با دلیل قابل قبول.
۲. نمونه جنینی می بایست توسط افراد و یا مراکز مورد تائید اخذ شود. نام مراکز هر ساله توسط اداره ژنتیک اعلام خواهد شد.
۳. نمونه ها می بایست همراه کد و نام خانم مورد بررسی(مادر) تحویل آزمایشگاه شوند. در غیر این صورت مسئولیت پذیرش با آزمایشگاه می باشد ولی این مورد باید در پرونده درج و به خانواده اطلاع داده شود و تعیین هویت برای اینگونه نمونه ها اجباریست.
۴. نمونه جنینی می بایست به همراه نتیجه سونوگرافی انجام شده توسط فرد نمونه گیر (که بعد از نمونه گیری صورت می گیرد) با درج سن جنین، تعداد قلها، تاریخ سونوگرافی، وضعیت ضربان قلب جنین و اطلاعات جنبی دیگر به آزمایشگاه تحویل شود. اگر نمونه گیری در محل آزمایشگاه انجام می شود این اطلاعات باید در پرونده موجود باشد.
۵. نمونه جنینی باید توسط افراد واجد شرایط و آموزش دیده مورد دستورزی و یا تمیز کردن قرار گیرد.
۶. نمونه CVS باید زیر میکروسکوپ وارونه و یا استریو میکروسکوپ تمیز و جداسازی شود.

۷. در صورتیکه نتایج بررسی مولکولی جنین از نظر موتاسیون و روش غیرمستقیم شبیه مادر باشد اصالت نمونه جنینی ضروری می باشد (اثبات تعلق نمونه جنینی به خانواده مورد بررسی بطور کلی برای کلیه نمونه های جنینی توصیه می شود).
۸. چنانچه نمونه جنینی مایع آمنیون باشد غیر از بررسی مولکولی از جمله تعیین موتاسیون و روش غیر مستقیم (ذکر شده در مرحله اول) (در صورت نیاز مایع امنیون کشت شود و بررسی بر روی سلولهای کشت داده شده انجام گیرد و اثبات تعلق نمونه جنینی به خانواده مورد بررسی صورت گیرد.

تبصره ۱- برای خانمهای زیر ۳۵ سال بررسی کروموزومی به خانواده در صورت واجد اندیکاسیون (مثلا از طریق آزمایشات Quadriple test) توصیه می شود (توضیح کافی مبنی بر عدم پوشش بیمه باید به صورت کاملاً و شفاف به خانواده توضیح داده شود).
تبصره ۲- در صورتیکه نمونه برای اختلال کروموزومی بررسی می شود کشت نمونه باید انجام و یا QFPCR و یا روش مشابه انجام و در صورت ابتلا جنین به بیماری مورد آزمایش، بررسی کروموزومی متوقف شود. در صورت درخواست خانواده مبنی بر عدم سقط جنین مبتلا به بیماری مورد آزمایش بررسی کروموزومی می تواند ادامه یابد.
تبصره ۳: چنانچه خانواده قصد دارند از روش NIPT وضعیت سندروم را در جنین مشخص کنند آزمایشگاه می تواند انجام آنرا تا زمان نمونه گیری به تاخیر بیاندازد زیرا با گرفتن نمونه جنینی به راحتی می توان با روش ارزانتر (مثلا QFPCR) تکلیف را مشخص کرد.