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 ارزیابی 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 در زمان بازدیدها بعنوان امتیاز تلقی خواهد شد.

دستورالعمل کشوری
تشخیص ناقلین و قبل از
تولد فنیل کیتونوری
(PKU, OMIM #2616

(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.

این دستور العمل می بایست منطبق با دستورالعمل غربالگری بیماریهای متابولیک ارثی باشد.

۱. تشخیص قبل از تولد فنیل کتونوری PKU 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 پی کی یو می باشد، ابتدا می بایست جهش در فرد مبتلا دقیقا مشخص و بعد فرد مشکوک تعیین موتاسیون شود 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 فقط در صورت قطعیت درگیر بودن ژن PAH می تواند انجام شود.

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

۱,۳,۱. روش مستقیم

۱,۳,۱,۱. در روش مستقیم ابتدا جهش شناخته شده در خانواده (known familial mutation) (در صورت وجود در خانواده و یا فامیل نزدیک)، مورد بررسی قرار می گیرد و اگر جهش قبلا بررسی نشده باشد می بایست حداقل ۲ تا ۱۰ تا از موتاسیونهای زیر با روش ARMS و یا روشهای مشابه مورد بررسی قرار گیرند (S67P, IVS10nt546, L333F, L364del, R261Q, R252W, R176X, P281L, R261X, R243X).

طبق تعرفه اول ۲-۱۰ تا از جهش های شایع می بایست مورد بررسی قرار گیرند و در صورت عدم وجود جهش های شایع، آزمایشگاه می تواند نسبت به استفاده از روشهای دیگر مانند تعیین توالی و یا ... استفاده کند (به دستورالعمل اختصاصی برای تعرفه مراجعه شود).

تبصره ۱: این لیست توسط کمیته فنی تهیه و هر ساله در صورت نیاز اصلاح و اعلام خواهد شد.

تبصره۲: در صورتیکه جهش خاصی در یک استان وجود داشته باشد آزمایشگاه می تواند آن جهش را در لیست بررسی قرار دهد ولی لازم است اداره ژنتیک را مطلع نماید. آزمایشگاه نمی تواند بدون بررسی جهش های شایع مستقیما از روش تعیین توالی استفاده کند.
تبصره۳: برای نام گذاری موتاسیون ها و نوع آنها به سایت زیر مراجعه شود:
http://www.pahdb.mcgill.ca

۱,۳,۱,۲. برای بررسی سایر موتاسیونها می توان از روش های نظیر SSCP,CSGE و ... و سپس Sequencing و یا مستقیماً sequencing استفاده کرد (هر چند امروزه روش تعیین توالی بیشتر مورد استفاده می باشد).

۱,۳,۱,۳. چنانچه آزمایشگاه حدس می زند که علت حذف ژنی باشد می تواند از MLPA و یا روشهای مشابه مانند Real Time PCR و یا Gap PCR استفاده کند.

۱,۳,۱,۴. در صورتیکه موتاسیون مشخص نشود و هپلوتایپ (Haplotype) گویا وجود نداشت نمونه می بایست برای NGS ارسال شود.

۱,۳,۲. روش غیرمستقیم

استفاده از روشهای غیر مستقیم در هر تشخیص قبل از تولد ضروری می باشد. برای استفاده از روشهای غیر مستقیم می توان از VNTR، STRs و SNP ها استفاده کرد. می توان از هر یک از چندحالتی های گویا (Informative Polymorphic Markers) برای نتیجه گیری استفاده کرد.
تبصره: در صورتیکه آزمایشگاه به ضرورت کمی زمان و یا علل قابل توجیح دیگر (مثلا عدم همکاری خانواده) مجبور شود که فقط از روش غیر مستقیم استفاده کند، PKU کلاسیک بودن محرز شود.

گزارش مرحله اول فنیل کتونوری:

(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 VNTR و .....، روش مستقیم با روش ARMS و یا تعیین توالی و جهش پیدا شده در فرد مبتلا و خانواده مثلاً IVS10nt546)

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.

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 فنیل کتونوری PKU 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 باردارییهای 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 فقط با استفاده از روش غیرمستقیم مجاز می باشد، مشروط بر اینکه پی کی یو کلاسیک باشد و گرنه باید اول جهش مشخص شود و یا با روش Linkage درگیر بودن ژن مورد بررسی (مثلا PAH) 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.

۲،۳. نحوه گزارش مرحله دوم PKU

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

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
۱۳- نتیجه موتاسیون والدین (فرزند مبتلا یا ناقل) و جنین.

نتیجه بررسی روشهای مولکولی به طور دقیق اعلام شود (مثلا استفاده از روش غیر مستقیم مثلاً VNTR و .....، روش مستقیم با روش ARMS و یا تعیین توالی و جهش پیدا شده در فرد مبتلا و خانواده مثلاً IVS10nt546)

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.

۱۱- نتیجه گیری نهایی وضعیت جنین و توضیح اینکه سالم، مبتلا یا ناقل است.
۱۲- Disclaimer (ذکر احتمال خطا)
۱۳- 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 PKU

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، پی کی یو کلاسیک بودن باید محرز باشد.

گزارش مرحله اول و دوم PKU

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.