وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

عنوان سند:

دستورالعمل کشوری

تشخیص ناقلین و تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی

شماره سند:

HD-GO-00-MN-WI-006-02

تاریخ	ویرایش	شرح اقدام	تهیه‌کنندگان	تاییدکنندگان	تصویب‌کننده
۱۳۹۹/۲/۱۲	00	۱- ایجاد ویرایش نخست سند در فرمت اسناد اداره ژنتیک از سند مادر؛ بازنگری اسفند ۹۸ ۲- شماره‌گذاری سند	کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک امضا	اداره ژنتیک وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی امضا	آزمایشگاه مرجع سلامت امضا
۱۳۹۹/۴/۴	01	اضافه شدن زیربند ۱-۲ جهت اعمال تصمیمات اتخاذ شده در جلسه سه‌شنبه مورخ ۹۸/۱۰/۱۷ برای موارد آلفا-تالاسمی شامل - اضافه شدن آیتم ج به زیربند ۵-۱-۲=۱ - اضافه شدن تبصره ۱ به زیربند ۵-۱-۳-۶ -اضافه شدن شکل ۸ به سند با عنوان جدول متقاطع پیشنهادی برای تشخیص زوجین پرخطر برای بروز بتا-تالاسمی در زیربند ۵-۶-۸	کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک امضا	اداره ژنتیک وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی امضا	آزمایشگاه مرجع سلامت امضا
۹۹/۱۲/۶	02	۱- اصلاح آیتم‌های "ب" و "ج" در زیر بند ۵-۱-۲-۱ ۲- اصلاح عنوان‌ها در بندهای ۵-۴ و ۵-۵ **توجه:** تغییرات با هایلایت زرد مشخص شده‌اند.	**کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک** **امضا**	**اداره ژنتیک** **وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی** **امضا**	**آزمایشگاه مرجع سلامت** **امضا**
			نام : سمت: امضا	نام : سمت: امضا	نام : سمت: امضا

۱) هدف از ایجاد: هدف از تدوین این سند در کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک، ارائه یک دستورالعمل کشوری برای تشخیص ناقلین و تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی جهت جلوگیری از تولد کودکان مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور است.

۱-۱) بازنگری این سند طبق نظر هریک از کارکنان ذی‌صلاح و با تایید بالاترین مقام ذی‌صلاح امکان‌پذیر است.

۱-۲) با توجه به ضرورت «تعیین اندیکاسیون تشخیص ژنتیک مولکولی آلفا تالاسمی در بستر برنامه کشوری پیشگیری از بروز بتاتالاسمی ماژور» و تصمیمات اتخاذ شده در جلسه برگزار شده در روز سه‌شنبه مورخ ۹۸/۱۰/۱۷ (ساعت ۸:۳۰ الی ۱۱:۰۰)، ویرایش ۱ این سند در تاریخ ۱۳۹۹/۴/۴ ایجاد شده است.

۱-۳) ویرایش ۲ این سند در تاریخ ۱۳۹۹/۱۲/۶ ؛ با توجه به تغییرات مشخص شده در صفحه شناسنامه سند، ایجاد شده است.

۲) دامنه کاربرد: این دستورالعمل برای بیماری‌های نام برده شده در آن در کلیه آزمایشگاه‌های تشخیص ژنتیک پزشکی به ویژه در آزمایشگاه‌های تشخیص ژنتیک عضو شبکه تشخیص پیش از تولد؛ همکار با برنامه‌های کشوری اداره ژنتیک وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، کاربرد دارد.

۳) منابع: در تدوین این دستورالعمل از منابع ذیل استفاده شده است:

۳-۱) استاندارد INSO-ISO 15189

۳-۲) آیین نامه مستندسازی، شماره‌گذاری، کنترل مدارک، بازنگری و ... به شماره HD-GO-00-MN-RE-001

3-3) D.J. Weatherall, J.B. Clegg. The Thalassaemia Syndromes, Fourth Edition, 2001.
3-4) Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. Blood Rev. 2003 Mar;17(1):43-53.
3-5) Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. Blood. 2001 Jul 1;98(1):250-1.

۴) تعاریف:

۴-۱) روش اجرایی: سندی که در آن نحوه و چگونگی انجام کار با تعیین مسئولیت‌های انجام کار شرح داده شده است.

۴-۲) دستورالعمل کاری: سندی که در آن جزئیات انجام کار به طور دقیق شرح داده شده و جنبه دستور کار را برای مجری دارد.

۴-۳) آیین نامه: سندی که ضوابط کلی و مقررات تعیین شده برای موضوعات مختلف سازمانی را مشخص کرده به طوری که در تدوین روش‌ها و دستورالعمل‌های کاری این چارچوب‌ها لازم‌الاجرا است.

۴-۴) استانداردهای داخلی: اسنادی که برای انجام کار در سازمان به صورت قطعی تعیین شده است.

۴-۵) کارگروه تعیین استانداردهای تشخیص ژنتیک: کارگروهی است که به منظور تعیین دستورالعمل‌ها و استانداردهای تشخیص ژنتیک بر اساس استانداردهای مورد نیاز از سوی وزارت بهداشت با حضور آزمایشگاه مرجع سلامت، اداره ژنتیک، انجمن‌های ژنتیک و شخصیت‌های علمی صاحب نظر تشکیل شده و در این سند به اختصار کمیته عنوان می‌شود.

۵) شرح سند:

مقدمه: این سند به عنوان یک دستورالعمل برای کلیه آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص پیش از تولد (برای بیماری‌های نام برده شده در آن) کاربرد دارد. روسای آزمایشگاه/ مسئولین فنی هر آزمایشگاه، جهت مدیریت صحیح تشخیص بیماری لازم است نکات ضروری مورد نیاز جهت تشخیص بیماری را با توجه به الزامات فنی استاندارد INSO-ISO 15189 رعایت نمایند. در این قسمت لازم است الزامات فضا، الزامات کارکنان، الزامات تجهیزات، الزامات قبل از آزمایش، حین آزمایش و پس از آزمایش شامل صدور و گزارش نتایج و نحوه حفظ اطلاعات و داده‌ها مد نظر قرار گیرد. رعایت کلیه موارد ذکر شده در این دستورالعمل برای کلیه آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص پیش از تولد (برای بیماری‌های نام برده شده در آن) الزامی است و در ممیزی‌های ادواری آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص پیش از تولد رعایت موارد زیر بر اساس چک‌لیست‌های مرتبط به بیماری در تعهد، مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت. رعایت موارد مزبور برای آزمایشگاه‌هایی که قصد عضویت در شبکه را دارند و یا در زمینه‌های ذکر شده فعالیت می‌کنند توصیه می‌شود و هنگام بررسی تقاضا در زمان بازدیدها به عنوان امتیاز تلقی خواهد شد. در این دستورالعمل راهنمایی لازم برای یک تشخیص دقیق و مناسب آورده شده است و آزمایشگاه با رعایت بسیاری از این موارد در زمینه استقرار یک برنامه تشخیصی دقیق، راهنمایی می‌شود.

۵-۱) تشخیص بتا-تالاسمی مرحله اول:

۵-۱-۱) پذیرش عمومی:

پذیرش خانواده و یا بیمار با معرفی پزشک مشاوره ژنتیک از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک همراه فرم ارجاع (فرم شماره ۳) صورت می‌گیرد. برای شروع آزمایشات مرحله اول تشخیص قبل از تولد لازم است زوجین به همراه نتایج کلیه آزمایشات خون شناسی و الکتروفورز هموگلوبین (CBC و مقدار HbA_2، HbF و واریانت‌های هموگلوبین) به آزمایشگاه ژنتیک منتخب ارجاع داده شوند.

تبصره: چنانچه پذیرش خانواده یا بیمار از طریق معرفی پزشک متخصص صورت گیرد باید فرم ارجاع (فرم شماره ۳) از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک توسط زوجین دریافت و به آزمایشگاه تحویل داده شود (این فرم می‌تواند در زمان جوابدهی تحویل داده شود).

در مرحله اول، آزمایشاتCBC و الکتروفورز هموگلوبین دقیقاً بررسی می‌شود و چنانچه بررسی آزمایشات تناقض یا ابهام جدی وجود داشته باشد مسئول فنی آزمایشگاه ژنتیک می‌تواند تکرار آزمایش را مطالبه نماید. لازم است علاوه بر میزان HbA_2، مقدار HbF و واریانت‌های هموگلوبین (در صورت وجود) نیز مورد بررسی دقیق قرار گیرد. آزمایشگاه ژنتیک باید فرم پذیرش استاندارد را طراحی و در هنگام پذیرش خانواده ها اطلاعات لازم را وارد کند. هم چنین قبل از نمونه‌گیری باید فرم رضایت‌نامه از زوجین توسط آزمایشگاه ژنتیک اخذ شود. مدت زمان ارائه نتیجه از زمان پذیرش تا جوابدهی (turnaround time) در مرحله اول PND حداکثر یک ماه است. این زمان برای PND مرحله دوم (بررسی جنین) دو هفته است. در صورت نیاز به زمان بیشتر آزمایشگاه قبل از اتمام زمان فوق باید با ذکر دلیل به خانواده اطلاع دهد. در صورتی‌که آزمایشگاه لازم ببیند می‌تواند از دیگر افراد خانواده مانند پدر و مادر آقا و خانم نیز تقاضای نتیجه

آزمایش CBC و یا خون نماید. عدم همکاری زوجین نمی‌تواند باعث عدم پذیرش زوجین شود. در این خصوص زوجین ملزم به همکاری در این زمینه هستند.

تبصره: پس از بررسی دقیق نتایج آزمایشات خون‌شناسی و نسبت‌های HbA_2, HbF, HbA و دیگر انواع هموگلوبین از طریق الکتروفورز یا ستونی، نوع آزمایشات مولکولی مشخص می‌شود.

۵-۱-۲) آزمایش برای بتا –تالاسمی و انواع هموگلوبینوپاتی‌ها و ترکیبات آن (مانند سیکل سل- تالاسمی یا بتا-دلتا تالاسمی و ...)

۵-۱-۲-۱) تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی ـ مرحله اول

پذیرش عمومی:

الف: پذیرش خانواده و یا بیمار با معرفی پزشک مشاور ژنتیک از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک به همراه فرم شماره ۳ شبکه خدمات آزمایشگاهی ژنتیک و تشخیص قبل از تولد صورت می‌گیرد.

تبصره۱: در صورتی که پذیرش بیمار و یا خانواده با معرفی پزشک متخصص مشاور دانشگاهی صورت گرفت باید فرم شماره ۳ از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک توسط خانواده دریافت و به آزمایشگاه تحویل داده شود. این امر می‌تواند در زمان جوابدهی صورت گیرد و دریافت جواب منوط به آن می‌شود.

ب: در هنگام پذیرش، در این حالت می‌بایستی هر دو نفر زوجین قطعا ناقل تالاسمی بتا باشند ($MCV<80$ fl ,$MCH<27$ pg, $HbA_2>3.5$) و یا یکی ناقل بتا-تالاسمی و دیگری ناقل سیکل سل ، لپور، دلتا-بتا تالاسمی و یا امثالهم باشد.

ج: زوجهایی که اندکس های خونی پایین و $HbF>3$ و HbA2 نرمال دارند، به عنوان ناقل تالاسمی دلتا-بتا شناخته و درخواست PND مرحله اول بتا تالاسمی برای آنها داده می شود.

تبصره ۱: در این موارد مقدار HbA_2 و $HbF>3$ با روش کاپیلاری الکتروفورزیس تایید شده باشد.

تبصره۲: چنانچه در بررسی آزمایشات تناقض یا ابهامی جدی وجود داشت مسئول فنی آزمایشگاه ژنتیک می‌تواند تکرار آزمایش را از پزشک مطالبه کند. در صورتی که آزمایش انجام شده در مرکز بهداشت با روش کاپیلری بوده و با آزمایش تکرار شده و نیز تست‌های ژنتیک انجام شده مغایرت دارد مراتب جهت بررسی و رفع مشکلات می‌بایستی کتبا به اداره ژنتیک گزارش شود.

تبصره۳: برای آزمایشات مرحله اول تشخیص قبل از تولد در صورتی که خانواده دارای فرزند مبتلا نباشد نمونه خون و آزمایشات خون شناسی والدین آنها و یا فرد دیگری از خانواده برای انجام آزمایشات به روش غیرمستقیم مورد نیاز است و میبایستی توسط آزمایشگاه اخذ شوند. چنانچه خانواده دارای فرزند مبتلا باشد نمونه خون فرزند مبتلا و والدین وی برای انجام ازمایشات کافی است.

د: برای تشخیص قبل از تولد انجام توام آزمایش‌های تعیین موتاسیون (روش مستقیم) و مطالعه پیوستگی ژنی (از جمله RFLP ، SNP، .....) (روش غیرمستقیم) ضروری است.

تبصره: تشخیص قبل از تولد برای زوجینی که هر دو ناقل سیکل سل و یا دلتا – بتا-تالاسمی و امثالهم باشند مانند تالاسمی با ملاحظات تشخیصی خاص در هر مورد است.

ه: برای انجام هر PND (مرحله اول، مرحله اول و دوم) می‌بایست کلیه مستندات آزمایشگاهی شامل فرم پذیرش، کاربرگ‌های آزمایشگاهی (Work sheet)، برگه تصمیم‌گیری، برگه‌های آنالیز نتایج، دفتر آزمایشات، فرم ردیابی نمونه، پرونده خانواده به همراه فرم رضایت نامه تکمیل شده (Consent form) و بقیه موارد که توسط آن‌ها می‌توان آزمایشات خانواده را پیگیری کرد وجود داشته باشد. توصیه می‌شود که در پرونده آزمایشگاهی هر خانواده روند کار به صورت فرم پیگیری روزشمار آورده شود. مانند روز و یا روزهای مراجعه، دریافت نمونه خون، دریافت نمونه جنینی، دریافت آزمایشات خون‌شناسی، شروع و پایان کار آزمایشگاهی و ..... مشخص شود.

۵-۱-۲-۱-۱) روش مستقیم:

برای تعیین موتاسیون در ژن بتا- گلوبین میتوان حداقل ۲۰ جهش شایع کشور را که توسط محققین تعیین شده‌اند (جدول ۱) برای زوجین یا فرزند مبتلای آنها به روش ARMS-PCR مورد بررسی قرار داد (چنانچه موتاسیون از طریق فرزند بیمار خانواده مشخص شده باشد جهت تایید موتاسیون یافت شده، والدین بیمار باید مورد بررسی قرار گیرند). البته آزمایشگاه می‌تواند بر اساس فراوانی جهش یا جهش‌های خاص منطقه این لیست را تهیه کند. استفاده از نمونه‌های مشخص شده قبلی (کنترل‌ها) در هر مورد ضروری است. یعنی در هر مورد ARMS آزمایشگاه می‌بایست کنترل‌ها به صورت هموزیگوت نرمال، هتروزیگوت جهش مورد بررسی و هموزیگوت آن جهش را در کنار نمونه‌های خانواده مورد آزمایش قرار دهد. کنترل‌ها می‌تواند توسط آزمایشگاه از نمونه‌های مراجعه‌کننده تهیه شود و یا از بانک‌های DNA داخلی تهیه شود. لیست پرایمرهای ARMS-PCR به پیوست این دستورالعمل است (رجوع به بند ۵-۶).

جدول شماره ۱: موتاسیون‌های شایع بتا-تالاسمی در ایران

IVSII-1 (G to A)	IVSI-5 (G>C)	IVSI-110 (G > A)	Fr8-9 (+G)	C36-37 (-T)	IVSI-1 (G to A)	CD30 (G to C)	CD39 (C to T)	CD44 (+T)	CD5 (-CT)
CD22 (G to T)	-25del	C82-83 (-G)	IVSII-745 (C to G)	CD15 (G to A)	-28 (A to G)	IVSI-128 (T to G)	CD 8 (-AA)	CD37 (G to A)	-88 (C to T)

چنانچه با بررسی جهش‌های شایع، موتاسیون مشخص نشد، باید تعیین موتاسیون با روش Sequencing ژن بتا- گلوبین انجام شود. آزمایشگاه می‌تواند از همان ابتدا (بدون بررسی جهش‌های شایع) از روش تعیین توالی برای یافتن جهش‌های ژن بتا- گلوبین نیز استفاده کند.

چنانچه پس از انجام موارد فوق، موتاسیون مشخص نشد آزمایشگاه باید با استفاده از روش‌هایی مانند Gap- PCR یا MLPA وجود جهش‌های حذفی در خوشه ژنی بتا را بررسی نماید (در مواردی که بر اساس نتایج خون‌شناسی و نظر مسئول فنی قبل از تعیین توالی، جهش‌های حذفی بررسی می‌شوند و جهش حذفی توجیه‌کننده نتایج خون‌شناسی شناسایی می‌گردد نیازی به تعیین توالی نیست).

تبصره: با توجه به ضرورت به حداقل رسانیدن خطای تشخیص در صورت یافتن موتاسیون روش غیرمستقیم (به شرح زیر) نیز می‌بایست انجام شود.

۵-۱-۲-۱-۲) روش غیرمستقیم:

مطالعه پیوستگی ژنی (بررسیSTR ,RFLP، SNP و ... متصل به خوشه ژنی بتا-گلوبین) برای زوجین و فرزند مبتلای آنها و در صورت نداشتن فرزند مبتلا برای خانواده آن‌ها انجام می‌شود.

آزمایشگاه می‌بایست به حداقل یک محل گویا دست یابد و محل گویا بدون هیچ ابهامی قابل تفسیر باشد. در روش غیرمستقیم مشروط بر این که موتاسیون هر دو (زوجین) مشخص باشد حداقل یک محل گویا کافی است. چنانچه از RFLP و یا SNPها استفاده می‌شود برای یافتن محل گویا محل‌های زیر می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند (بهتر است بررسی با مارکرهای داخل ژن بتا- گلوبین آغاز گردد) (جدول ۲). استفاده از نمونه‌های مشخص شده قبلی (کنترل‌ها) در هر مورد ضروری است. پرایمرهای PCR-RFLP به همراه مشخصات آنزیم‌ها و قطعات ایجاد شده به پیوست است (رجوع به بند ۵-۶).

جدول شماره ۲: مارکرهای RFLP در خوشه ژنی بتا-گلوبین

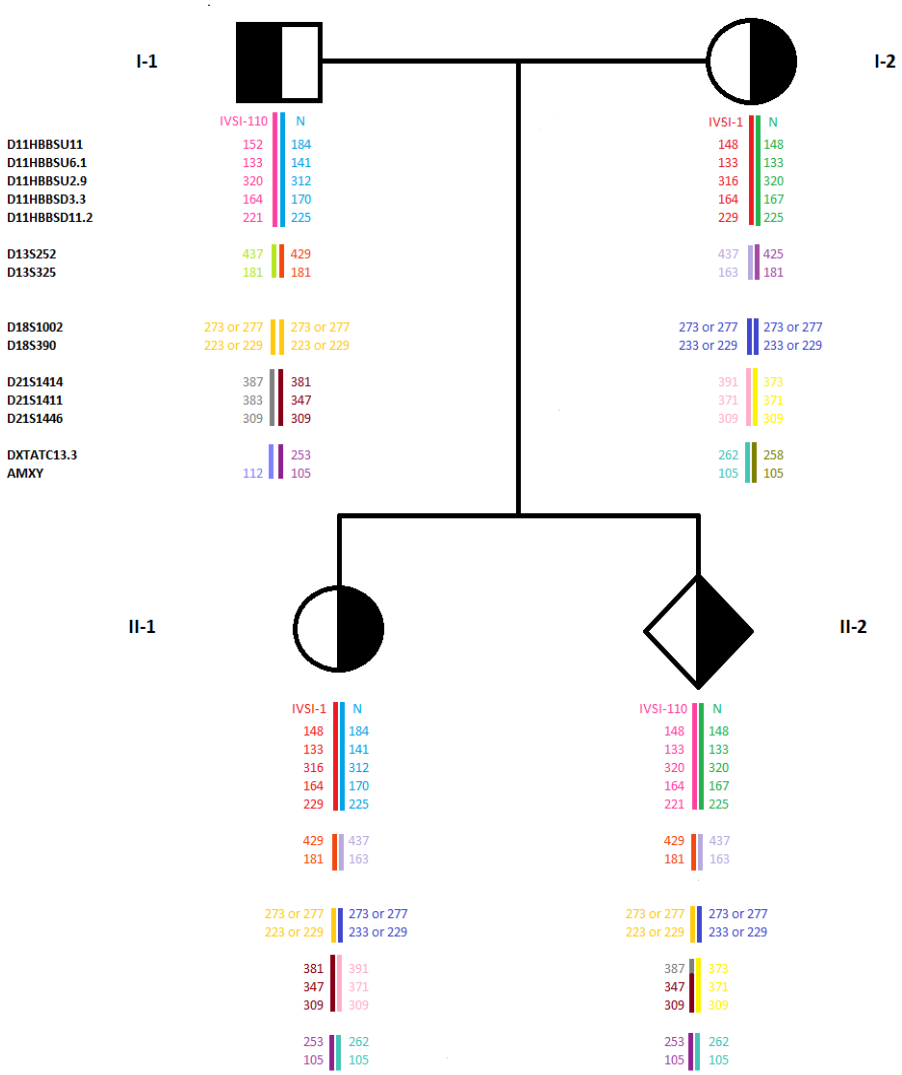
HincII-5'ψβ	HindIII-γ^A	HindIII-γ^G	XmnI	HincII-ε
دیگر SNPها	HinfI-β	AvaII-β	RsaI-, β	HincII-3'ψβ

تبصره ۱: روش غیرمستقیم فقط در صورت عدم همکاری خانواده (بر اساس مستندات موجود در پرونده مربوطه) قابل حذف است.

تبصره ۲: در صورتی که نتیجه روش غیرمستقیم مبنای تصمیم‌گیری باشد، ناقل بتا-تالاسمی بودن فرد باید محرز شود (مثلاً تکرار آزمایشات خون شناسی، داشتن فرزند مبتلا و...).

تبصره ۳: در صورتی که در انجام RFLP، SNP و ... گویایی دیده نشد ، چنانچه در تعیین توالی SNP مشاهده شد می‌تواند به عنوان روش غیرمستقیم محسوب شود.

تبصره ۴: در صورتی که آزمایشگاه به محل گویا دست نیافت می‌تواند از طریق هاپلوتایپینگ یا آنالیز پیوستگی (Haplotyping or Linkage analysis) با استفاده از مارکر های STR متصل به دو طرف ژن استفاده کند. در صورتی که آزمایشگاه از این روش استفاده کرد، نیازی به استفاده از مارکر های SNP نیست. مثال زیر کاربرد STRهای متصل به ژن بتا-گلوبین را نشان می‌دهد. در شکل زیر مارکرهای اصلی بر روی کروموزوم ۱۱ (D11 HBB...) هستند و بقیه مارکرها به منظورهای دیگر مانند تایید اصالت نمونه، عدم آلودگی نمونه جنینی به مادر، تعیین هویت اولیه، احتمال وجود تریزومی، و ... قرار داده شده اند. جنین II-2 ژن معیوب را از پدر دریافت کرده است.



تبصره ۵: در صورتی که آزمایشگاه بعد از انجام مراحل فوق (مستقیم یا غیرمستقیم و یا هردو) نتوانست به نتیجه برسد و زوجین قطعا ناقل بتا باشند، لازم است آزمایشگاهی را که با آن دبل چک انجام داده است را به صورت کتبی همراه با جزئیات پرونده مورد مشاوره قرار دهد و آن آزمایشگاه می‌بایست ظرف یک هفته بعد از دریافت درخواست، نظر خود را کتباً اعلام نماید. چنانچه آزمایشگاه مورد مشاوره نیاز به بررسی نتایج و یا نمونه خانواده داشت آزمایشگاه محیطی می‌بایست همکاری لازم را به عمل آورد. هزینه انجام آزمایشات و مشاوره با آزمایشگاه محیطی است.

تبصره ۶: : در صورتی که بعد از بررسی‌های فوق آزمایشگاه نتیجه بگیرد که نیازی به PND مرحله دوم تالاسمی نیست، می‌تواند آزمایشگاهی را که با آن دبل چک انجام داده است مورد مشاوره کتبی قرار دهد و آزمایشگاه مورد مشاوره می‌بایست ظرف یک هفته بعد از دریافت درخواست، نظر خود را به صورت کتبی اعلام نماید. هزینه انجام آزمایشات و مشاوره با آزمایشگاه محیطی است.

تبصره ۷: چنانچه در موارد ذکر شده در تبصره‌های ۵ و ۶ امکان مشاوره گرفتن از آزمایشگاهی که دبل چک با آن انجام شده است وجود نداشته باشد یا آزمایشگاه مورد مشاوره قادر به حل مشکل نباشد، آزمایشگاه محیطی می‌تواند آزمایشگاه مرجع را مورد مشاوره کتبی قرار دهد و آزمایشگاه مرجع تشخیص ژنتیک (بیماری مربوطه) نیز می‌بایست ظرف یک هفته بعد از دریافت درخواست، نظر خود را به صورت کتبی اعلام نماید. هزینه انجام آزمایشات و مشاوره با آزمایشگاه محیطی است.

۵-۱-۳) تشخیص موارد خاص پیش از تولد تالاسمی و هموگلوبینوپاتی‌ها به قرار زیر است:

۵-۱-۳-۱) چنانچه یکی از زوجین قطعاً ناقل بتا و دیگری ناقل HbS باشد نیاز به PND است (مانند بتا-تالاسمی عمل شود).

۵-۱-۳-۲) چنانچه یکی از زوجین قطعاً ناقل بتا و دیگری ناقل HbC باشد نیاز به PND نیست (به سایت ApoGI به آدرس http://2000.apogi.info/ مراجعه شود).

۵-۱-۳-۳) چنانچه یکی از زوجین قطعاً ناقل بتا و دیگری ناقل HbE باشد نیاز به PND است (مانند بتا-تالاسمی عمل شود).

۵-۱-۳-۴) چنانچه یکی از زوجین قطعاً ناقل بتا و دیگری ناقل دلتا-بتا-تالاسمی و یا لپور(Lepore) باشد نیاز به PND است (مانند بتا-تالاسمی عمل شود).

۵-۱-۳-۵) چنانچه یکی از زوجین قطعاً ناقل بتا و دیگری ناقل HbD باشد نیاز به PND ندارد. (HbD فقط با HbS نیاز به PND دارد). یادآوری می‌شود که کسی که ناقل هموگلوبین D باشد دارای MCV و MCH نسبتا طبیعی ولی مقدار HbA_2 حدود ۳/۴ تا ۳/۷ است که دلالت بر ناقل بتا-تالاسمی ندارد. اگر فردی واجد هموگلوبین D بیش از ۵۰ درصد (معمولا بیش از ۷۰٪) بود و مقدار MCV و MCH وی نزدیک مرز بود (مثلا بیش از ۷۶ و ۲۶) وی به احتمال زیاد ناقل هموزیگوت D است ولی اگر با همین مقدار واجد CBC غیرعادی (مثلا MCV و MCH کمتر از ۷۵ و ۲۵) بود و HbA_2 وی بیشتر از ۳/۵ بود وی به احتمال زیاد ناقل همزمان هموگلوبین D و بتا-تالاسمی

است. لذا آزمایشگاه باید بتواند بین وضعیت هموزیگوت هموگلوبین D و ناقل توام D و بتا-تالاسمی تفکیک قائل شود.

۵-۱-۳-۶) چنانچه یکی از زوجین قطعاً ناقل بتا و دیگری ناقل Alpha triplication باشد ممکن است نیاز به PND داشته باشند (ضرورت انجام مرحله دوم باید با مشورت آزمایشگاه مرجع تشخیص ژنتیک و با مشورت هماتولوژیست منتخب برنامه صورت گیرد).

تبصره ۱: با توجه به این که تریپلیکیشن آلفا دارای شیوع پایینی است و در اکثریت موارد ناقل این حالت واجد CBC طبیعی می باشد و علامتی ندارد، غربالگری و بررسی همه زوجین از نظر وجود آلفا تریپلیکیشن توصیه نمی‌شود. اما اگر در فردی که ناقل بتا-تالاسمی است و در بررسی مولکولی دارای فقط یک جهش هتروزیگوت در ژن بتا گلوبین و در CBC مقادیر Hb و RBC پایین و در الکتروفورز میزان HbF بالا باشد (احتمال ابتلا به تالاسمی اینتر مدیا) آزمایشگاه می‌تواند بررسی مولکولی از نظرآلفا تریپلیکیشن را انجام دهد. البته بررسی والدین چنین فردی نشان خواهد داد که یکی ناقل بتا تالاسمی و دیگری CBCو الکتروفورز هموگلوبین طبیعی خواهد داشت (مگر اینکه همزمان ناقل الفا تالاسمی نیز باشد). لذا فقط در مواردی که یک فرد به طاهر مبتلا به تالاسمی اینتر مدیا می باشد و بررسی بیشتر و یا والدین فرد دلالت بر وجود الفا تریپلیکیشن می دهد می توان الفا تریپلیکیشن را یا با PCRاختصاصی و یا MLPA خوشه ژنی آلفا-گلوبین بررسی کرد.

۵-۱-۳-۷) بیماری داسی شکل Sickle cell disorders و حالت‌های مختلف آن مانند موارد زیر نیاز به PND دارند:

۱. Sickle cell anaemia (Hb SS) هموزیگوت سیکل سل با یک فرد ناقل سیکل سل
۲. Hb SC disease هر دو طرف ناقل سیکل سل هستند
۳. Hb S/ß-thalassaemia یکی ناقل سیکل سل و دیگر بتا-تالاسمی
۴. Hb S/D Punjab یکی ناقل سیکل سل و دیگری ناقل هموگلوبین D
۵. Hb S/HbO Arab یکی ناقل سیکل سل و دیگر هموگلوبین O Arab
۶. Hb S/δβ thal یکی ناقل سیکل سل و دیگری دلتا-بتا-تالاسمی (انواع آن)

۵-۱-۳-۸) هموگلوبینوپاتی‌هایی که بی‌خطر محسوب می‌شوند:

۱. Hb C/ß-thalassaemia
۲. Hb D/ß-thalassaemia
۳. Hb D/HbD
۴. Hb C/HbC
۵. Hb C/HbD
۶. Hb C/HbE
۷. Hb D/HbE
۸. Hb E/HbE

۵-۱-۳-۹) در مورد سایر هموگلوبینوپاتی‌ها از منابع ذیل استفاده و تصمیم‌گیری شود:

A database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias
http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html

http://www.chime.ucl.ac.uk/APoGI

http://2000.apogi

www.screening.nhs.uk/sickleandthal
http://www.sickleandthal.org.uk/Documents/LabHandbook2006.pdf

خلاصه اطلاعات مربوط به برهم‌کنش انواع جهش‌ها و واریانت‌های شایع ژن بتا- گلوبین در جدول شماره ۳ آورده شده است.

جدول شماره ۳: خلاصه برهم‌کنش انواع واریانت‌های شایع خوشه ژنی بتا-گلوبین.

	β-thal	δβ-thal	HbS	HbD	HbE	Hb Lepore	HbC	HbO Arab
β- thal	+	+	+	–	+	+	–	+
δβ- thal	+	+	+	–	+	+	–	+
HbS	+	+	+	+	+	+	+	+
HbDPanjub	–	–	+	–	–	–	–	-
HbE	+	+	+	–	–	+	–	-
HbLepore	+	+	+	–	+	+	–	+
HbC	–	–	+	–	–	–	–	-
HbO Arab	+	+	+	-	-	+	-	-

+ یعنی ریسک بروز بیماری ژنتیکی و کم‌خونی وجود دارد (ارجاع به PND1) - یعنی ریسک بروز بیماری ژنتیکی و کم‌خونی وجود ندارد (عدم نیاز به ارجاع به PND1) .

تعریف دلتا-بتای هتروزیگوت: MCV<80, MCH<27, HbA_2: NL, HbF>3

تبصره: چنانچه در نتایج الکتروفورز، واریانتی شناسایی شد، حتما نیاز به تایید نوع واریانت با روش مولکولی است و تنها پس از اطمینان از نوع واریانت با روش مولکولی می توان در مورد نیاز یا عدم نیاز به تشخیص پیش از تولد قضاوت نمود.

میزان واریانت شناسایی شده در نتیجه الکتروفورز می‌تواند جهت بررسی احتمال همزمانی تالاسمی با هموگلوبینوپاتی مورد استفاده قرار گیرد. یک فرد می‌تواند همزمان ناقل بتا-تالاسمی و هموگلوبینوپاتی باشد و با فرد دیگری که ناقل بتا-تالاسمی و یا واریانت‌های مختلف باشد ازدواج کند.

نیاز به PND در مورد این زوج‌ها باید بسته به شرایط تعیین گردد. لذا تصمیم به انجام یا عدم انجام مرحله دوم PND برای دیگر حالت‌های هموگلوبینوپاتی‌ها بر اساس منطق علمی و ادله کافی و در صورت نیاز بر اساس

درخواست و نظر کتبی آزمایشگاهی که با آن دبل چک انجام داده است صورت پذیرد. چنانچه امکان مشاوره گرفتن از آزمایشگاهی که دبل چک با آن انجام شده، نباشد یا آزمایشگاه مورد مشاوره قادر به حل مشکل نباشد، آزمایشگاه محیطی می‌تواند آزمایشگاه مرجع تشخیص ژنتیک را مورد مشاوره کتبی قرار دهد و آزمایشگاه مرجع تشخیص ژنتیک نیز می‌بایست ظرف یک هفته بعد از دریافت درخواست، نظر خود را به صورت کتبی اعلام نماید. هزینه انجام آزمایشات احتمالی لازم الاجرا و مشاوره با آزمایشگاه محیطی است.

۵-۱-۴) نحوه گزارش‌دهی مرحله اول:

بعد از انجام آزمایشات فوق آزمایشگاه می‌بایست گزارش کتبی تهیه کرده و به خانواده، پزشک، مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک و یا در صورت درخواست قانونی به مراجع ذیصلاح ارائه دهد.

۵-۱-۴-۱) گزارش مرحله اول باید شامل حداقل موارد زیر باشد:

۱. نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند)
۲. شماره پرونده /شماره مولکولی
۳. نحوه معرفی به آزمایشگاه (مرجع معرفی خانواده)
۴. آدرس و مشخصات آزمایشگاه (گزارش می‌بایست در سربرگ آزمایشگاه نوشته شود)
۵. تاریخ اولین مراجعه خانواده (تاریخ دریافت نمونه خون)
۶. محل نمونه‌گیری یا ارسال نمونه و نوع نمونه
۷. تاریخ گزارش نهایی
۸. روش یا روش‌های تشخیص مولکولی (مستقیم، غیرمسقیم، نوع موتاسیون و نتیجه روش غیرمستقیم مشخص باشد).
۹. نتیجه بررسی روش‌های مولکولی (برای مثال IVSII-1 به روشSequencing، و یا به روش ARMS-PCR وPCR-RFLP .... تشخیص داده شده است) .در گزارش فارسی یا انگلیسی می‌بایست نام موتاسیون و نتیجه بررسی غیر مستقیم(فقط محل‌های گویا) ذکر شود.
۱۰. در متن فارسی امکان یا عدم امکان تشخیص قبل از تولد و نیاز و یا عدم نیاز به تشخیص قبل از تولد و زمان مراجعه ذکر شود. مثلا نوشته شود موتاسیون بیماری‌زا یافت شد و احتمال ابتلاء جنین به بتا-تالاسمی ۲۵٪ است و یا نیاز به مشاوره با متخصص .... دارد.
۱۱. هر گزارش باید جملاتی در خصوص احتمال خطا (disclaimer) داشته باشد (در ضمیمه یک نمونه آمده است).
۱۲. نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی و نام کارشناسی که مسئول پرونده است آورده شود.

۵-۱-۵) ثبت داده های PND:

بعد از انجام آزمایشات و ارائه گزارش، آزمایشگاه موظف به ثبت داده‌های مربوط به خانواده در سامانه اداره ژنتیک در فواصل و با استانداردهای تعیین شده و بهنگام است. نحوه ثبت داده‌ها از طریق دستورالعمل‌های جداگانه‌ای به اطلاع آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص رسیده است.

نکته مهم: شخص مسئول مسئول صحت و تکمیل داده‌های ارسالی است.

در ادامه به برخی نکات مورد تاکید در ثبت داده‌ها اشاره شده است:

- حتما شماره هر پرونده ثبت گردد.
- گزینه‌های مربوط به نام موتاسیون بتا (و آلفا) حتما باید تکمیل گردند و این گزینه‌ها نباید خالی باقی بمانند. حتما نام جهش ثبت گردد و هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن جهش در ثبت اطلاعات مورد توجه قرار گیرد.
  - چنانچه بررسی انجام نشده حتما اصطلاح "بررسی نشده" در محل مربوط به آن ثبت و از ثبت "نرمال" در این موارد خودداری گردد.
  - تنها در صورتی که علیرغم انجام آزمایش مولکولی کامل، جهشی یافت نشده از اصطلاح "نرمال" استفاده شود.
  - در صورتی که تنها جهش‌های شایع بررسی شده و نرمال بوده از اصطلاح "فاقد جهش‌های شایع" استفاده شود.
- تمامی موارد مربوط به خون‌شناسی شامل MCV,MCH, Hb, HbA_2 به صورت صحیح و کامل (با حداقل یک رقم اعشار) تکمیل گردند. چنانچه آهن درمانی انجام شده، حتما نتایج خون شناسی پس از آهن درمانی نیز ثبت گردد.

۵-۲) تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی: مرحله دوم

۵-۲-۱) مرحله دوم تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی برای کسانی صورت می‌پذیرد که مرحله اول را قبل از بارداری و یا درهفته‌های اول بارداری انجام داده‌اند و وضعیت مولکولی آنها مشخص شده است.

۵-۲-۱-۱) اعزام خانواده برای اخذ نمونه جنینی بعد از محرز شدن ناقل بودن زوجین صورت گیرد. قبل از اعزام سن بارداری و وضعیت Rh مشخص شده باشد. اعزام خانواده برای گرفتن نمونه جنینی با هماهنگی آزمایشگاه ژنتیک صورت گیرد و برای اعزام خانواده جهت نمونه‌گیری از جنین (مثلا CVS) لازم است سن بارداری بعد از هفته دهم باشد (تایید شده از طریق سونوگرافی). توصیه می‌شود گروه خونی مادر و وضعیت Rh مشخص شود. چنانچه خانواده به موقع مراجعه کرده باشد ترجیحا نمونه گیری بین هفته ۱۱-۱۲ صورت گیرد.

۵-۲-۱-۲) نمونه CVS حتماً باید توسط فرد آموزش دیده زیر میکروسکوپ Invert یا استریوسکوپ تمیز شود. آزمایشگاه می‌بایستی بانک نمونه جنینی تهیه و حداقل برای ۵ سال نگهداری کند.

۵-۲-۱-۳) نمونه جنینی می‌بایست به همراه DNA والدین برای تعیین موتاسیون و روش غیرمستقیم (به شرحی که در مرحله اول PND ذکر شده) مورد آزمایش قرار گیرد. در صورت استفاده از روش ARMS-PCR نمونه جنینی برای موتاسیون والدین می‌بایست حداقل ۲ بار مورد آزمایش قرار گیرد. استفاده از نمونه‌های مشخص شده قبلی (کنترل‌ها) در هر مورد ضروری است. اگر تشخیص با روش تعیین توالی صورت می‌گیرد می‌بایست قطعه PCR حاوی جهش خانواده از دو طرف تعیین توالی شود.

۵-۲-۱-۴) چنانچه در زمان نمونه‌گیری از جنین سن جنین بیش از ۱۴ هفته باشد توصیه می‌شود 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 می‌گیرد، آزمایشات لازم بر روی نمونه جنینی می‌بایست حداقل ۲ بار تکرار شوند. توصیه می‌شود آزمایشگاه بعد از مهلت قانونی سقط بررسی‌های خود را جهت تکمیل ژنوتیپ یا هاپلوتیپ، برای بارداری‌های احتمالی بعدی انجام دهد.

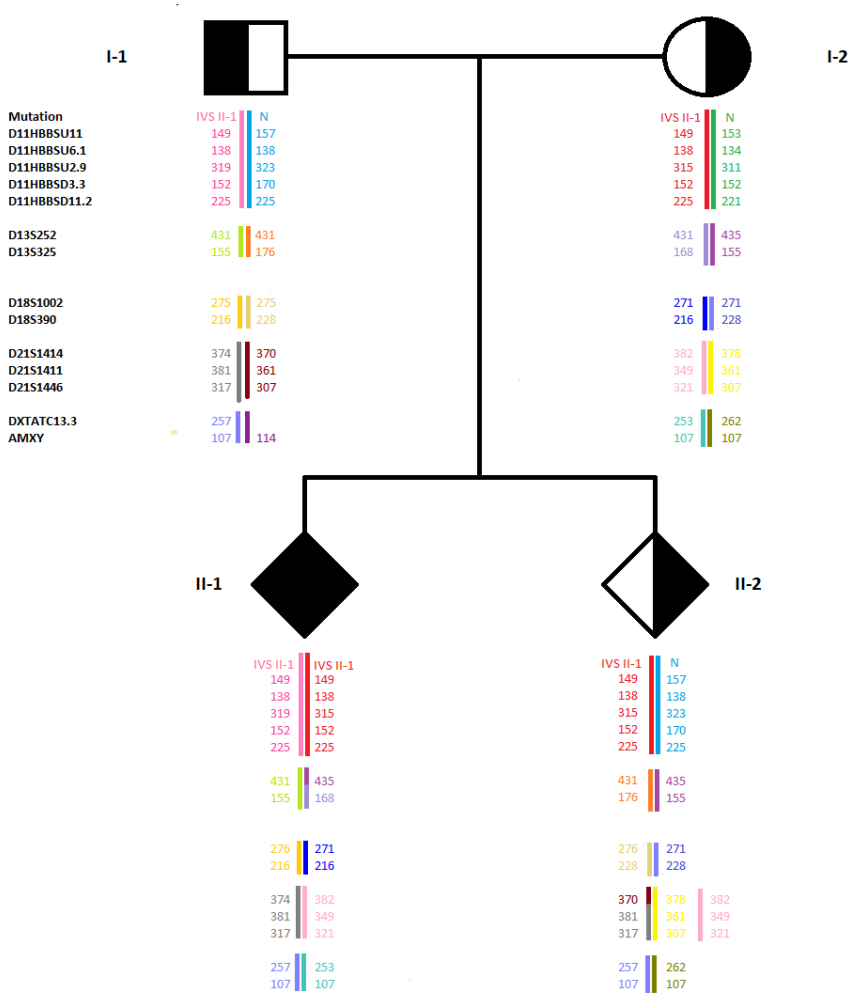
تبصره ۱: در صورتی که مراجعه خانواده بعد از آخر هفته ۱۶بارداری باشد و آزمایشگاه نتواند قبل از اتمام مهلت قانونی سقط درمانی به جواب برسد به شرط مطلع کردن به موقع خانواده، مقصر شناخته نمی‌شود (بهتر است آزمایشگاه از خانواده رضایت‌نامه لازم را اخذ نماید). این مورد در صورتی صحت دارد که مراجعه خانواده به همان آزمایشگاه مرحله اول باشد.

تبصره ۲: 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 استفاده از روش غیرمستقیم مجاز است (در صورت قطعیت ناقل بودن زوجین به شرحی که در بالا آمد).

تبصره ۳: چنانچه آزمایشگاه محیطی در مرحله اول و دوم و یا دوم ظرف دو هفته نتوانست به نتیجه برسد و امکان به جواب نرسیدن قبل از اتمام مهلت قانونی سقط درمانی وجود داشته باشد، ضمن ادامه آزمایشات می‌بایست نمونه والدین و جنینی و ..... را طی نامه رسمی به همراه نتایج خون‌شناسی و نتایج بررسی‌های مولکولی به عمل آمده به آزمایشگاهی که با آن دبل چک انجام داده است ارسال دارد. آزمایشگاه مورد مشاوره ظرف حداکثر یک هفته می بایستی مشاوره لازم و دقیق را به صورت کتبی به آزمایشگاه محیطی ارائه دهد. چنانچه امکان مشاوره گرفتن از آزمایشگاهی که دبل چک با آن انجام شده نباشد یا آزمایشگاه مورد مشاوره قادر به حل مشکل نباشد، آزمایشگاه محیطی می تواند آزمایشگاه مرجع را مورد مشاوره کتبی قرار دهد و آزمایشگاه مرجع نیز می‌بایست ظرف یک هفته بعد از دریافت درخواست، نظر خود را به صورت کتبی اعلام نماید. هزینه انجام آزمایشات و مشاوره با آزمایشگاه محیطی است.

تبصره ۴: چنانچه با فرض تبصره ۳ (بالا) آزمایشگاه نتواند به موقع وضعیت جنین را مشخص کند گزارش به همراه دلیل عدم تشخیص قطعی و احتمال خطر ظرف یک هفته بعداز نمونه‌گیری جنین به خانواده داده شود.

۵-۲-۲) در صورتی که وضعیت مولکولی جنین از نظر موتاسیون و روش غیرمستقیم شبیه نتایج مادر باشد تعیین هویت جنین (رفع شبهه با نمونه مادری) ضروری است (تعیین هویت مولکولی به طور کلی برای کلیه نمونه‌های جنینی توصیه می‌شود زیرا در مواردی می‌تواند خطای جابجایی نمونه را مشخص کند). در مواردی که جنین سالم است، تایید صحت نمونه (تعلق نمونه جنین به پدر و مادر) الزامی است مثل شکل زیر که از STRهای خوشه ژنی بتا- گلوبین استفاده شده است (در این مورد جنین II-2 برای تالاسمی ناقل ولی احتمالا مبتلا به سندروم داون است و باید با روش QF-PCR بر روی همان نمونه جنینی وجود تریزومی تایید شود تا مجوز سقط داده شود).



۵-۲-۲-۱) چنانچه نمونه جنینی مایع آمنیون باشد غیر از بررسی مولکولی از جمله تعیین موتاسیون و روش غیرمستقیم (ذکر شده در مرحله اول) کشت آن انجام شود و بررسی بر روی سلول‌های کشت داده شده باید انجام گیرد. در ضمن می‌بایست رفع شبهه مانند بالا مثلا با روش DNA typing انجام شود.

۵-۲-۲-۲) توصیه می‌شود برای خانم‌هایی که در زمان نمونه‌گیری جنین حداقل ۳۵ سال سن دارند (در صورت توافق خانواده) جهت اختلال عددی کروموزوم (سندرم داون) نیز بررسی شود (با هزینه مجزا). البته مبنا دستورالعمل یا سند پیشگیری از بروز سندروم داون خواهد بود.

تبصره ۱: برای خانم‌هایی که زیر ۳۵ سال سن دارند بررسی اختلالات عددی کروموزومی پیشنهاد شود حتی اگر خانم غربالگری را انجام داده و یا قصد انجام دارد مگر این که با روش NIPT سندروم‌های دوره بارداری بررسی شده باشد. ولی برای خانم‌های بالای ۳۵ سال اکیدا توصیه شود. البته مبتنی بر دستورالعمل یا سند پیشگیری از بروز سندروم داون خواهد بود.

تبصره ۲: در صورتی که نمونه برای اختلال کروموزومی بررسی می‌شود کشت نمونه صورت گیرد و یا QF-PCR و یا روش مشابه انجام شود. در صورت ابتلا جنین به تالاسمی بررسی کروموزومی متوقف شود. در صورت درخواست خانواده مبنی بر عدم سقط جنین مبتلا به تالاسمی بررسی کروموزومی می‌تواند ادامه یابد.

تبصره ۳: بررسی سندروم‌ها باید بعد از تعیین وضعیت جنین برای تالاسمی باشد زیر اگر جنین مبتلا به تالاسمی باشد و خانواده قصد سقط جنین مبتلا را داشته باشند نیازی به بررسی سندروم‌ها نیست.

۵-۲-۳) گزارش مرحله دوم بتاـ تالاسمی

بعد از انجام آزمایش‌های ذکر شده (بر اساس موارد فوق) آزمایشگاه می‌بایست 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.

۵-۲-۳-۱) گزارش می‌بایست شامل موارد زیر باشد:

۱. نام و نام خانوادگی زوجین (و فرزند مبتلا/ناقل/سالم در صورت وجود)
۲. شماره پرونده/شماره مولکولی
۳. نحوه معرفی به آزمایشگاه (مرجع معرفی خانواده)
۴. تاریخ مراجعه خانواده (مرحله دوم و یا اول و دوم)
۵. محل نمونه‌گیری از والدین و یا ارسال نمونه و نوع نمونه
۶. نوع نمونه جنینی و پزشک نمونه‌گیر
۷. آدرس و مشخصات آزمایشگاه (گزارش در سربرگ آزمایشگاه نوشته شود)
۸. تاریخ و سن جنین در هنگام نمونه‌برداری
۹. تاریخ صدور گزارش
۱۰. نتیجه موتاسیون والدین (فرزند مبتلا یا ناقل) و جنین.
۱۱. نتیجه روش غیرمستقیم والدین (فرزند مبتلا یا ناقل) و جنین
۱۲. نتیجه نهایی وضعیت جنین و توضیح این موضوع که جنین سالم، مبتلا یا ناقل است.
۱۳. Disclaimer (ذکر احتمال خطا)
۱۴. نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی و نام کارشناسی که مسئول پرونده است آورده شود.

۵-۲-۴) ثبت داده های PND :

بعد از انجام آزمایشات و ارائه گزارش، آزمایشگاه موظف به ثبت داده‌های مربوط به خانواده در سامانه اداره ژنتیک در فواصل و با استانداردهای اعلام شده و بهنگام است. نحوه ثبت داده‌ها از طریق دستورالعمل‌های جداگانه ای به اطلاع آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص رسیده است.

چنانچه جواب آزمایشات خون‌شناسی مادر مربوط به دوران بارداری ایشان باشد حتما در سامانه ثبت گردد.

سایر نکات مورد تاکید در انتهای قسمت تشخیص قبل از تولد بتا-تالاسمی مرحله اول ذکر شده است.

نکته مهم: شخص مسئول فنی مسئول صحت و تکمیل داده‌های ارسالی است.

تبصره: در صورتی که جنین مبتلا باشد آزمایشگاه می‌بایست نامه‌ای جداگانه برای سازمان پزشکی قانونی تهیه کرده و گواهی نماید که جنین مبتلا است. لازم است عکس زوجین به گواهی مربوطه الصاق و ممهور به مهر آزمایشگاه شود.

۵-۳) تشخیص قبل از تولد مرحله اول و دوم بتاـ تالاسمی

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

۵-۳-۱) گزارش مرحله اول و دوم بتاـ تالاسمی

بعد از انجام آزمایش‌های ذکر شده (بر اساس پروتکل تدوین شده) آزمایشگاه می‌بایست 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.

تبصره: در احتمال بروز خطا یا Disclaimer و نیز عدم اقدام به موقع و یا به جواب نرسیدن و یا در مراجعه دیر هنگام (بعد از هفته ۱۶ بارداری) و عدم امکان و یا دیر به جواب رسیدن به خانواده تذکر داده شود و در گرفتن رضایت‌نامه نیز اعلام شود.

۵-۳-۲) ثبت داده های PND:

بعد از انجام آزمایشات و ارائه گزارش، آزمایشگاه می‌بایستی داده‌های مربوط به خانواده را در سامانه اداره ژنتیک در فواصل و با استانداردهای اعلام شده و بهنگام ثبت نماید. نحوه ثبت داده‌ها از طریق دستورالعمل‌های جداگانه‌ای به اطلاع آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص رسیده است.

چنانچه جواب آزمایشات خون‌شناسی مادر مربوط به دوران بارداری ایشان باشد حتما در سامانه ثبت گردد.

نکته مهم: شخص مسوول فنی مسئول صحت و تکمیل داده‌های ارسالی است.

سایر نکات مورد تاکید در انتهای قسمت تشخیص قبل از تولد تالاسمی بتا ـ مرحله اول ذکر شده است.

۵-۴) تشخیص پیش از تولد مرحله اول برای زوج‌های بتا- مشکوک (که یکی ناقل قطعی بتا و دیگری دارای(MCV<75 fl و/یا MCH<26 pg و HbA_2<3.2 و HbF<3 هستند)

افراد ناقل گاما-دلتا-بتای تالاسمی و نیز افراد واجد دلتا-تالاسمی می‌توانند مقدار HbA_2 و HbF طبیعی داشته باشند، از طرفی امکان جواب اشتباه در الکتروفورز هموگلوبین و ... وجود دارد و در مواردی ممکن است فردی ناقل بتا-تالاسمی، مقدار MCV و یا MCH نزدیک به ۷۶ و ۲۶ داشته باشد. نکته دیگری که باید توجه کرد آن است که با توجه به فراوانی الفا-تالاسمی در کشور، تایید ناقل آلفا-تالاسمی بودن یک فرد دلیل بر ناقل بتا-تالاسمی نبودن وی نیست.

با توجه به اینکه ازدواج این افراد با فرد ناقل بتا-تالاسمی می‌تواند منجر به تولد فرد مبتلا شود، لذا لازم است هر گاه یک طرف ناقل قطعی بتا-تالاسمی بود و طرف دیگر مشکوک به بتا-تالاسمی یا آلفا بود، به علت تاکید دستور العمل کشوری به پیشگیری از بتا-تالاسمی و نیز شدت و یا احتمال بالای وابسته به خون شدن این بیماران، فرد مشکوک برای رد ناقل بتا-تالاسمی بودن مورد آزمایش قرار گیرد.

۵-۴-۱) پذیرش عمومی:

پذیرش خانواده و یا بیمار با معرفی پزشک مشاوره ژنتیک از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک همراه فرم ارجاع (فرم شماره ۳) صورت می‌گیرد. برای شروع آزمایشات مرحله اول تشخیص قبل از تولد لازم است خانواده به همراه نتایج کلیه آزمایشات انجام گرفته (آزمایشات خون‌شناسی، CBC و مقدار HbA_2 و HbF) به آزمایشگاه ژنتیک ارجاع شوند.

تبصره: چنانچه پذیرش بیمار از طریق معرفی پزشک متخصص صورت گیرد. باید فرم ارجاع (فرم شماره ۳) از مرکز بهداشتی و درمانی ویژه مشاوره ژنتیک توسط خانواده دریافت و به آزمایشگاه تحویل داده شود.

۵-۴-۲) انجام آزمایش:

برای فرد ناقل قطعی بتا، باید مرحله اول بتا-تالاسمی انجام و برای فرد مشکوک، بررسی بتا-تالاسمی صورت گیرد. بررسی بتا-تالاسمی باید با انجام تعیین توالی ژن بتا برای رد و یا تایید وجود جهش بیماری‌زا در ژن بتا-گلوبین و یا بررسی عدم وجود حذف در خوشه ژنی بتا-گلوبین انجام شود. برای بررسی عدم وجود حذف، آزمایشگاه می‌تواند مستقیما از روش MLPA استفاده کند و یا اول از چند SNP و یا RFLPهای اطراف ژن بتا-گلوبین استفاده کند. در صورتی که هر یک از SNPها و یا RFLP های داخل و یا اطراف ژن بتا-گلوبین گویا بودند می‌توان تفسیر کرد که فرد فاقد حذف ژنی است. البته آزمایشگاه باید به عدم وجود حذف اطمینان حاصل نماید. در صورتی که وجود جهش نقطه‌ای و یا حذف با این روش‌ها تایید شد فرد ناقل بتا-تالاسمی خواهد بود و چون زوج وی نیز ناقل قطعی بتا است مانند زوج ناقل بتا-تالاسمی کار ادامه یابد.

در صورتی که آزمایشگاه اطمینان پیدا کرد که فرد مشکوک، ناقل بتا-تالاسمی نیست اقدام بیشتری لازم نیست و گزارشی مبنی بر عدم نیاز به PND مرحله دوم برای بتا-تالاسمی به خانواده داده می‌شود.

۵-۴-۳) گزارش مرحله اول بتاـ تالاسمی / مشکوک

بعد از انجام آزمایش‌های ذکر شده (بر اساس موارد فوق) آزمایشگاه می‌بایست 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.

۵-۴-۳-۱) گزارش می‌بایست شامل موارد زیر باشد:

۱- نام و نام خانوادگی زوجین
۲- شماره پرونده/شماره مولکولی
۳- نحوه معرفی به آزمایشگاه (مرجع معرفی خانواده)
۴- تاریخ مراجعه خانواده
۵- محل نمونه‌گیری از خانواده و یا ارسال نمونه و نوع نمونه
۶- آدرس و مشخصات آزمایشگاه (گزارش در سربرگ آزمایشگاه نوشته شود)
۷- تاریخ صدور گزارش
۸- روش‌های مولکولی مورد استفاده
۹- نتیجه موتاسیون خانواده
۱۰- نتیجه روش غیرمستقیم خانواده
۱۱- نتیجه نهایی نیاز یا عدم نیاز به PND مرحله دوم بتا-تالاسمی
۱۲- Disclaimer (ذکر احتمال خطا)
۱۳- نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی و نام کارشناسی که مسئول پرونده است آورده شود.

تبصره ۱: این دستورالعمل برای جلوگیری از تولد کودکان مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور تدوین شده است و بنابراین مراکز درگیر در این فرایند (از مراکز بهداشت، پزشکان متخصص منتخب و آزمایشگاه‌های درگیر) مسئولیتی در خصوص تولد کودکان مبتلا به انواع بیماری‌های مربوط به آلفا-تالاسمی ندارند. با توجه به این که در مورد زوج‌های بتا- مشکوک، بر طبق این دستورالعمل نیازی به بررسی آلفا-تالاسمی نیست، بنابراین مراکز درگیر در این فرایند، مسئولیتی در خصوص Hemoglobin Barts hydrops fetalis و HbH Disease در مورد این زوج ها ندارند.

تبصره ۲: برای انجام هر PND (مرحله اول، مرحله اول و دوم) می‌بایست کلیه مستندات آزمایشگاهی شامل فرم پذیرش،کاربرگ‌های آزمایشگاهی Work sheet)، برگه تصمیم‌گیری، برگه‌های آنالیز نتایج، دفتر آزمایشات، فرم ردیابی نمونه، پرونده خانواده به همراه فرم رضایت نامه تکمیل شده (Consent form)و بقیه موارد که توسط آن‌ها می‌توان آزمایشات خانواده را پیگیری کرد وجود داشته باشد. توصیه می‌شود که در پرونده آزمایشگاهی هر خانواده روند کار بصورت فرم پیگیری روزشمار آورده شود. مانند روز و یا روزهای مراجعه، دریافت نمونه خون، دریافت نمونه جنینی، دریافت آزمایشات خون‌شناسی، شروع و پایان کار آزمایشگاهی و ..... مشخص شود.

۵-۴-۴) ثبت داده‌های PND:

بعد از انجام آزمایشات و ارائه گزارش، آزمایشگاه موظف به ثبت داده‌های مربوط به خانواده در سامانه اداره ژنتیک در فواصل و با استانداردهای اعلام شده و بهنگام است. نحوه ثبت داده‌ها از طریق دستورالعمل‌های جداگانه‌ای به اطلاع آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص رسیده است.

نکته مهم: شخص مسئول فنی مسئول صحت و تکمیل داده های ارسالی است.

سایر نکات مورد تاکید در انتهای قسمت تشخیص قبل از تولد بتا تالاسمی مرحله اول ذکر شده است.

۵-۵) تشخیص پیش از تولد مرحله اول برای زوج‌های مشکوک/مشکوک

۵-۵-۱) تشخیص پیش از تولد مرحله اول برای زوج‌های مشکوک – مشکوک، که هر دو دارای(MCV<75 fl و/یا MCH<26 pg و HbA_2>3.2 و HbF<3 هستند).

افراد ناقل گاما-دلتا-بتای تالاسمی و نیز افراد واجد دلتا-تالاسمی می توانند مقدار HbA_2 و HbF طبیعی داشته باشند، از طرفی امکان جواب اشتباه در الکتروفورز هموگلوبین و ... وجود دارد و در مواردی ممکن است فردی ناقل بتا-تالاسمی، مقدار MCV و یا MCH نزدیک به ۷۶ و ۲۶ داشته باشد. نکته دیگری که باید توجه کرد آن است که با توجه به فراوانی الفا-تالاسمی در کشور، تایید ناقل آلفا-تالاسمی بودن یک فرد دلیل بر ناقل بتا-تالاسمی نبودن وی نیست.

با توجه به این که ازدواج این افراد با یکدیگر می‌تواند منجر به تولد فرد مبتلا شود، لذا لازم است هر گاه زوج هر دو مشکوک به بتا-تالاسمی یا آلفا بودند، به علت تاکید دستورالعمل کشوری به پیشگیری از بتا-تالاسمی و نیز شدت و یا احتمال بالای وابسته به خون شدن این بیماران، حداقل یکی از دو فرد مشکوک برای رد ناقل بتا-تالاسمی بودن مورد آزمایش قرار گیرد.

برای این زوج‌ها یکی از دو حالت زیر امکان پذیر است که در ادامه به هر کدام از آنها اشاره شده است:

۵-۵-۱-۱) مواردی که حداقل یکی از دو طرف، MCH ≥ 23 با مقدار A_2 نرمال داشته باشند.

در این موارد باید بررسی بتا-تالاسمی در حداقل یکی از دو طرف صورت گیرد. بررسی بتا-تالاسمی باید با انجام تعیین توالی ژن بتا برای رد و یا تایید وجود جهش بیماری‌زا در ژن بتا-گلوبین و یا بررسی عدم وجود حذف در خوشه ژنی بتا-گلوبین انجام شود. برای بررسی عدم وجود حذف، آزمایشگاه می‌تواند مستقیما از روش MLPA استفاده کند و یا اول از چند SNP و یا RFLP های اطراف ژن بتا-گلوبین استفاده کند. در صورتی که هر یک از SNPها و یا RFLP های داخل و یا اطراف ژن بتا-گلوبین گویا بودند می‌توان تفسیر کرد که فرد فاقد حذف ژنی است؛ البته هر چند وظیفه آزمایشگاه است که به عدم وجود حذف اطمینان حاصل نماید. در صورتی که وجود جهش نقطه‌ای و یا حذف با این روش‌ها تایید شد فرد ناقل بتا-تالاسمی خواهد بود و باید زوج وی از نظر بتا-تالاسمی نیز بررسی شود. چنانچه هر دو ناقل بتا-تالاسمی باشند مانند زوج ناقل بتا-تالاسمی کار ادامه یابد. در صورتی که آزمایشگاه اطمینان پیدا کرد که حداقل یکی از دو فرد مشکوک ناقل

بتا-تالاسمی نیست اقدام بیشتری لازم نیست و گزارشی مبنی بر عدم نیاز به PND مرحله دوم برای بتا-تالاسمی به خانواده داده می‌شود.

لازم به ذکر مجدد است که این دستورالعمل برای جلوگیری از تولد کودکان مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور تدوین شده است و بنابراین مراکز درگیر در این فرایند (از مراکز بهداشت، پزشکان متخصص منتخب و آزمایشگاه‌های درگیر) مسئولیتی در خصوص تولد کودکان مبتلا به انواع بیماری‌های مربوط به آلفا-تالاسمی ندارند. با توجه به این که در مورد زوج‌های مشکوک– مشکوک، که حداقل یکی از دو طرف، $MCH \geq 23$ داشته باشند، بر طبق این دستورالعمل نیازی به بررسی آلفا تالاسمی نیست، بنابراین مراکز درگیر در این فرایند، مسئولیتی در خصوص Hemoglobin Barts hydrops fetalis و HbH Disease نیز در مورد این زوج ها ندارند.

۵-۵-۱-۲) مواردی که زوج هر دو $MCH < 23$ داشته باشند.

هرگاه زوجین معرفی شده از طرف مرکز بهداشت دارای MCH<23 باشند (با الکتروفورز هموگلوبین نرمال) باشند اول بررسی بتا-تالاسمی (جهش نقطه‌ای و حذف‌ها) در یکی از زوجین صورت می‌گیرد. بررسی بتا-تالاسمی باید با انجام تعیین توالی ژن بتا برای رد و یا تایید وجود جهش بیماری‌زا در ژن بتا-گلوبین و یا بررسی عدم وجود حذف در خوشه ژنی بتا-گلوبین انجام شود. برای بررسی عدم وجود حذف، آزمایشگاه می‌تواند مستقیما از روش MLPA استفاده کند و یا اول از چند SNP و یا RFLPهای اطراف ژن بتا-گلوبین استفاده کند. در صورتی که هر یک از SNPها و یا RFLPهای داخل و یا اطراف ژن بتا-گلوبین گویا بودند می‌توان تفسیر کرد که فرد فاقد حذف ژنی است البته هر چند وظیفه آزمایشگاه است که به عدم وجود حذف اطمینان حاصل نماید. در صورتی که وجود جهش نقطه‌ای و یا حذف با این روش‌ها تایید شد فرد ناقل بتا-تالاسمی خواهد بود و باید زوج وی از نظر بتا-تالاسمی نیز بررسی شود. چنانچه هر دو ناقل بتا باشند مانند زوج ناقل بتا-تالاسمی کار ادامه یابد. در صورتی که آزمایشگاه اطمینان پیدا کرد که حداقل یکی از دو فرد مشکوک ناقل بتا-تالاسمی نیست، زوجین باید برای جلوگیری از احتمال هیدروپس فتالیس (Hemoglobin Barts hydrops fetalis) در بارداری بررسی شوند. آزمایشگاه می‌بایست با روش‌هایی مانند بررسی حذف‌های شایع، و در نهایت بررسی حذف‌های ناشایع و ... وجود جهش به صورت Cis را در یکی از زوجین رد کند. البته آزمایشگاه ممکن است از طریق بررسی اندکس‌های خونی والدین آقا و خانم به این نتیجه برسد که آنها واجد جهش به صورت ترانس هستند. هر گاه جهش به صورت Cis در یکی از زوجین یافت شد طرف مقابل نیز باید مورد بررسی قرار گیرد و در صورتی که هر دو ناقل جهش به صورت Cis بودند تشخیص قبل از تولد برای جلوگیری از تولد کودک مبتلا به هیدروپس فتالیس توصیه شود.

این دستورالعمل برای جلوگیری از تولد کودکان مبتلا به بتا-تالاسمی ماژور تدوین شده است و مراکز درگیر در این فرایند (از مراکز بهداشت، پزشکان متخصص منتخب و آزمایشگاه‌های درگیر) مسئولیتی در خصوص تولد کودکان مبتلا انواع بیماری‌های مربوط به آلفا-تالاسمی ندارند. در خصوص هیدروپس فتالیس (مربوط به حذف‌های سیس در خوشه ژنی آلفا-گلوبین) که در جریان بررسی بتا-تالاسمی ماژور و بعد از رد آن و با داشتن MCH<23 و A_2 نرمال مشکوک به احتمال تولد کودک مبتلا به هیدروپس فتالیس خواهند بود بررسی جهش‌های سیس بر مبنای دستورالعمل اجرا شود.

۵-۵-۲) گزارش مرحله اول زوج های مشکوک / مشکوک

بعد از انجام آزمایش‌های ذکر شده (بر اساس موارد فوق) آزمایشگاه می‌بایست 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.

۵-۵-۲-۱) گزارش می‌بایست شامل موارد زیر باشد:

۱. نام و نام خانوادگی زوجین
۲. شماره پرونده/شماره مولکولی
۳. نحوه معرفی به آزمایشگاه (مرجع معرفی خانواده)
۴. تاریخ مراجعه خانواده
۵. محل نمونه گیری از خانواده و یا ارسال نمونه و نوع نمونه
۶. آدرس و مشخصات آزمایشگاه (گزارش در سربرگ آزمایشگاه نوشته شود)
۷. تاریخ صدور گزارش
۸. روش‌های مولکولی مورد استفاده
۹. نتیجه موتاسیون خانواده
۱۰. نتیجه روش غیرمستقیم خانواده
۱۱. نتیجه نهایی نیاز یا عدم نیاز به PND مرحله دوم بتا-تالاسمی یا هیدرپس فتالیس
۱۲. Disclaimer (ذکر احتمال خطا)
۱۳. نام و نام خانوادگی و امضاء و مهر مسئول فنی و نام کارشناسی که مسئول پرونده است آورده شود.

۵-۵-۳) ثبت داده های PND:

بعد از انجام آزمایشات و ارائه گزارش، آزمایشگاه موظف به ثبت داده‌های مربوط به خانواده در سامانه اداره ژنتیک است. نحوه ثبت داده‌ها از طریق دستورالعمل‌های جداگانه‌ای به اطلاع آزمایشگاه‌های عضو شبکه تشخیص رسیده است.

نکته مهم: شخص مسئول فنی مسئول صحت و تکمیل داده های ارسالی است.

سایر نکات مورد تاکید که در انتهای قسمت تشخیص قبل از تولد بتا تالاسمی مرحله اول ذکر شده است.

۵-۶) ضمائم

۵-۶-۱) شکل ۱: پرایمرهای ARMS-PCR (پرایمرهای موتانت)

۵-۶-۲) شکل ۲: پرایمرهای ARMS-PCR (پرایمرهای نرمال)

۵-۶-۳) شکل۳: جایگاه‌هایRFLP در خوشه ژنی بتا- گلوبین

۵-۶-۴) شکل ۴: پرایمرها و آنزیم‌های مرتبط با جایگاه های RFLP در خوشه ژنی بتا- گلوبین

۵-۶-۵) شکل ۵: پرایمرهای مربوط به Gap-PCR برای بررسی حذف‌های شایع خوشه ژنی آلفا گلوبین

۵-۶-۶) شکل ۶: محل قرارگیری پرایمرها برای بررسی حذف‌های آلفا و نتیجه حاصله بر روی ژل الکتروفورز

۵-۶-۷) شکل ۷: نمونه‌ای از Disclaimer (ذکر احتمال بروز خطا) که می‌بایست در تمامی گزارشات آورده شود.

معاونت بهداشت

Mutation	Oligonucleotide sequence	Second primer	Product size (bp)
–88 (C→T)	TCACTTAGACCTCACCCTGTGGAGCCTCAT	A	684
–87 (C→G)	CACTTAGACCTCACCCTGTGGAGCCACCCG	A	683
–30(T→A)	GCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGGAA	A	626
–29 (A→G)	CAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGTATG	A	625
–28 (A→G)	AGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCTTAG	A	624
CAP +1 (A→G)	ATAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGGTTC	A	597
CD5 (–CT)	TCAAACAGACACCATGGTGCACCTGAGTCG	A	528
CD6 (–A)	CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCC	B	207
CD8 (–AA)	ACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGCAGG	A	520
CD8/9 (+G)	CCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCACACC	B	225
CD15 (G→A)	TGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCAGTA	A	500
CD16 (–C)	TCACCACCAACTTCATCCACGTTCACGTTC	B	238
CD17 (A→T)	CTCACCACCAACTTCAGCCACGTTCAGCTA	B	239
CD24 (T→A)	CTTGATACCAACCTGCCCAGGGCCTCTCCT	B	262
CD39 (C→T)	CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTA	B	436
CD41/42 (–TCTT)	GAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAACCT	B	439
CD71–72 (+A)	CATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAAG	C	241
IVS1-1 (G→A)	TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACCGAT	B	281
IVS1-1 (G→T)	TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACCGAAA	B	281
IVS1-5 (G→C)	CTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGTTAG	B	285
IVS1-6 (T→C)	TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG	B	286
IVS1-110 (G→A)	ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATAGAGT	B	419
IVS2-1 (G→A)	AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT	B	634
IVS2-654 (C→T)	GAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAACGT*	D	829
IVS2-745 (C→G)	TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGG*	D	738
β^SCD6 (A→T)	CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCA	B	207
β^CCD6 (G→A)	CCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCGTT	B	206
β^ECD26 (G→A)	TAACCTTGATACCAACCTGCCCAGGGCGTT	B	236

The above primers are coupled as indicated with primers A, B, C or D:
A CCCCTTCCTATGACATGAACTTAA;
B ACCTCACCCTGTGGAGCCAC;
C TTCGTCTGTTTCCCATTCTAAACT; or
D GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA.
The control primers used for all the above mutation-specific ARMS primers except the two marked * are primers D plus E: CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC. For IVS2-654 (C→T) and IVS2-745 (C→G), the $^G\gamma$-*Hind* III restriction-fragment-length polymorphism (RFLP) primers (Table 16.6) are used as control primers.

شکل ۱: پرایمر های ARMS-PCR (پرایمرهای موتانت)

Table 16.6 Primer sequences used for the detection of the normal DNA sequence by the allele-specific priming technique.

Mutation	Oligonucleotide sequence	Second primer	Product size (bp)
–87 (C→G)	CACTTAGACCTCACCCTGTGGAGCCACCCCA	A	683
CD5 (–CT)	CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCT	A	528
CD8 (–AA)	ACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGCAGA	A	520
CD8/9 (+G)	CCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCACACT	B	225
CD15 (G→A)	TGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCAGTA	A	500
CD39 (C→T)	TTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGTCCC	A	299
CD41/42 (–TCTT)	GAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAAAGA	B	439
IVS1-1 (G→A)	TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACCCAC	B	281
IVS1-1 (G→T)	GATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGTAGG	A	455
IVS1-5 (G→C)	CTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGTTAC	B	285
IVS1-6 (T→C)	AGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGT	A	449
IVS1-110 (G→A)	ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC	B	419
IVS2-1 (G→A)	AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC	B	634
IVS2-654 (C→T)	GAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAACGC	D	829
IVS2-745 (C→G)	TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC	D	738
β^SCD6 (A→T)	AACAGACACCATGGTGCACCTGACTCGTGA	A	527
β^ECD26 (G→A)	TAACCTTGATACCAACCTGCCCAGGGCGTC	B	236

See Table 16.5 footnote for details of primers A–D and control primers.

شکل ۲: پرایمر های ARMS-PCR (پرایمرهای نرمال)

معاونت بهداشت

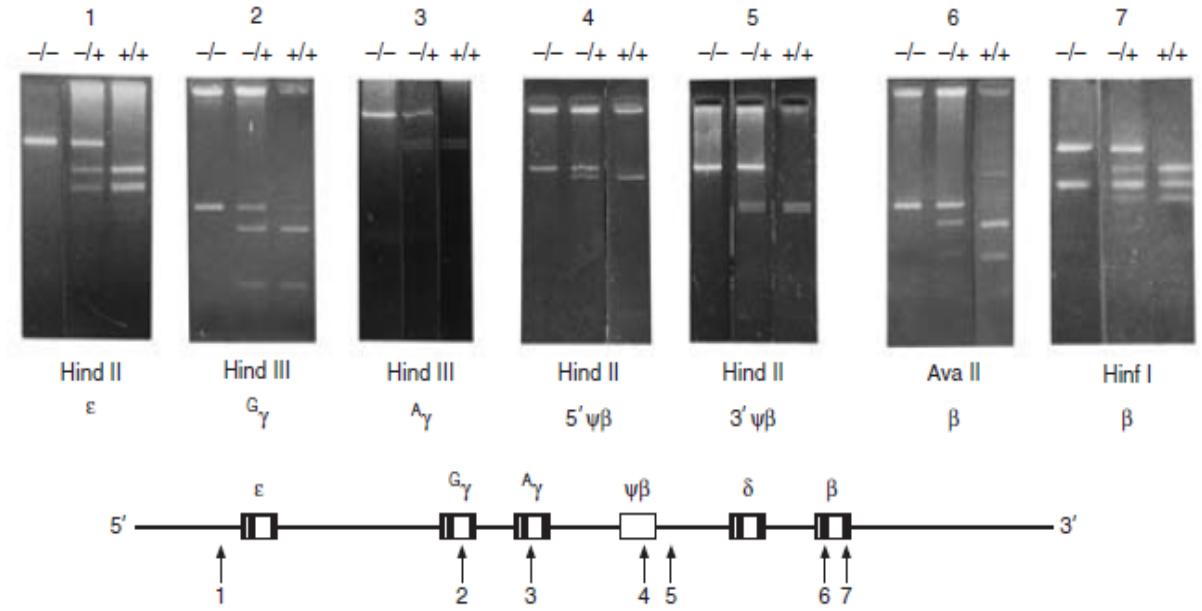


Fig. 16.7 PCR analysis of the seven β-globin-gene RFLPs which make up the standard β-globin-gene haplotype. Each gel shows the digestion products of amplified DNA from patients homozygous for the absence of the RFLP site (–/–), heterozygous for the presence of the site (–/+) and homozygous for the presence of the site (+/+), using the primers listed in Table 16.8. The approximate location of each RFLP site is shown underneath the gel pictures.

شکل ۳: جایگاه های RFLP در خوشه ژنی بتا- گلوبین

RFLP and primers: 5′ primer 3′ primer	Product size (bp)	Coordinates on GenBank sequence U01317	Absence of site (bp)	Presence of site (bp)	Annealing temperature (°C)
Hind II/ε	760		760	315	55
5′TCTCTGTTTGATGACAAATTC		18652–18672		445	
5′AGTCATTGGTCAAGGCTGACC		19391–19411			
Xmn I/Gγ	657		657	455	55
5′AACTGTTGCTTTATAGGATTTT		33862–33883		202	
5′AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC		34495–34518			
Hind III/Gγ	326		326	235	65
5′AGTGCTGCAAGAAGAACAACTACC		35677–35700		91	
5′CTCTGCATCATGGGCAGTGAGCTC		35981–36004			
Hind III/Aγ	635		635	327	65
5′ATGCTGCTAATGCTTCATTAC		40357–40377		308	
5′TCATGTGTGATCTCTCAGCAG		40971–40991			
Hind II/5′ωβ	795		795	691	55
5′TCCTATCCATTACTGTTCCTTGAA		46686–46709		104	
5′ATTGTCTTATTCTAGAGACGATTT		47457–47480			
Ava II/ωβ	795		795	440	55
Sequence as for Hind 5′ RFLP		46686–46709		355	
		47457–47480			
Hind II/3′ωβ	913		913	479	55
5′GTACTCATACTTTAAGTCCTAACT		49559–49582		434	
5′TAAGCAAGATTATTTCTGGTCTCT		50448–50471			
Rsa I/β	1200		411	330	55
5′AGACATAATTTATTAGCATGCATG		61504–61527	plus constant fragments	81 plus 694	
5′CCCCTTCCTATGACATGAACTTAA		62680–62703	of 694 & 695	& 695	
Ava II/β	328		328	228	65
5′GTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGG		62416–62439		100	
5′TTCGTCTGTTTCCCATTCTAAACT		62720–62743			
Hinf I/β	474		320	213	55
5′GGAGGTTAAAGTTTTGCTATGCTGTAT		63974–64001	plus constant	107	
5′GGGCCTATGATAGGGTAAT		64429–64447	fragment of 154	& 154	

شکل ۴: پرایمرها و آنزیم های مرتبط با جایگاه های RFLP در خوشه ژنی بتا- گلوبین

Table 1. Primer sequences for α-thalassemia multiplex PCR and expected amplicon sizes

Name	5′→3′ sequence	GenBank ID: nucleotides	Concentration	Amplicon (size)
LIS1-F	ATACCATGGTTACCCCATTGAGC	HSLIS10:510→532	0.5 μM	LIS1 3′UTR fragment (2350 bp)
LIS1-R	AGGGCTCATTACATGTGGACCC	HSLIS10:2859→2838	0.5 μM	
α2/3.7-F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4:5676→5694	0.2 μM	$-\alpha^{3.7}$ jxn[a] fragment (2022/2029 bp)
3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4:11514→11494	0.2 μM	
α2/3.7-F	As above	As above	—	*α2* gene (1800 bp)
α2-R	AGACCAGGAAGGGCCGGTG	HUMHBA4:7475→7457	0.2 μM	
4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	HUMHBA4:3064→3084	0.5 μM	$-\alpha^{4.2}$ jxn fragment (1628 bp)
4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTTCCC	HUMHBA4:8942→8920	0.5 μM	
SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	HSGG1:26120→26140	0.2 μM	$--^{SEA}$ jxn fragment (1349 bp)
SEA-R	AGCCCACGTTGTGTTCATGGC	HSCOS12:3817→3797	0.2 μM	
THAI-F	GACCATTCCTCAGCGTGGGTG	HSGG1:9592→9612	0.3 μM	$--^{THAI}$ jxn fragment (1153 bp)
THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	HSCOS12:1241→1221	0.3 μM	
20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	HSGG1:17904→17924	0.2 μM	$-(\alpha)^{20.5}$ jxn fragment (1007 bp)
3.7/20.5-R	As above	As above	—	
MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	HSGG1:23123→23144	0.2 μM	$--^{MED}$ jxn fragment (807 bp)
MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	HSGG1:41203→41183	0.2 μM	
FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	HSGG1:12304→12327	1.0 μM	$--^{FIL}$ jxn fragment (546 bp)
FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	HSCOS12:570→546	1.0 μM	

jxn, junction.

شکل ۵: پرایمرهای مربوط به Gap-PCR برای بررسی حذف های شایع خوشه ژنی آلفا گلوبین

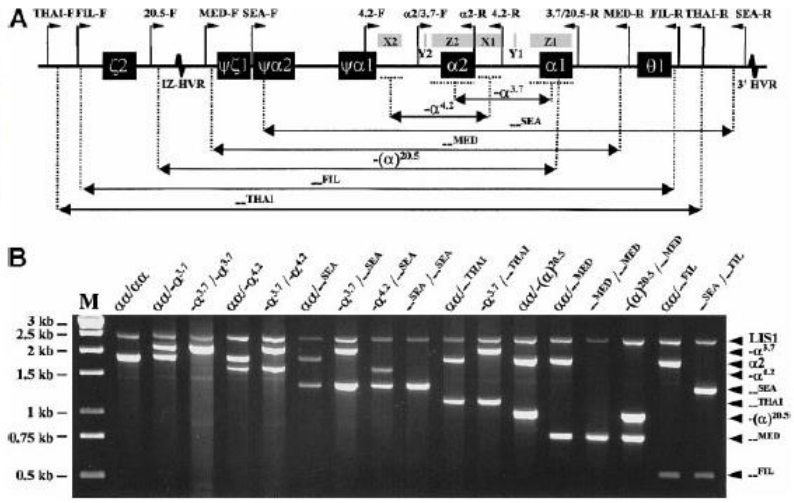


Figure 1. Strategy and results of α-thalassemia multiplex polymerase chain reaction analysis. (A) Schematic representation of the α-globin gene cluster, indicating extents of the 7 deletions and relative positions of the primers (except for the control LIS1-F and LIS1-R primers, which are located on a different chromosome). Locations of X, Y, and Z sequence homology boxes and hypervariable regions (HVRs) are also shown. (B) Multiplex PCR results from genomic DNA samples with various α-globin genotypes. M indicates Generuler 1kb DNA ladder (Fermentas, St Leon-Rot, Germany).

شکل ۶: محل قرار گیری پرایمرها برای بررسی حذف های آلفا و نتیجه حاصله بر روی ژل الکتروفورز

It is of utmost 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 نام آزمایشگاه گزارش‌دهنده 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 email.

شکل ۷: نمونه ای از Disclaimer (ذکر احتمال بروز خطا) که می بایست در تمامی گزارشات آورده شود.

۶) مستندات: -

معاونت بهداشت