



معاونت درمان

دبیرخانه شورای راهبردی تدوین راهنماهای سلامت

شناسنامه و استاندارد خدمت

Qf-PCR

(بادامه تشخیص بیماری های ژنتیک)

تابستان ۱۳۹۹

## تنظیم و تدوین:

جناب آقای دکتر سیامک میراب سمیعی (آزمایشگاه مرجع سلامت)

سرکارخانم دکتر سماوات (اداره ژنتیک)

جناب آقای دکتر سعید رضا غفاری (موسسه ابن سینا)

جناب آقای دکتر سیروس زینلی (انستیتو پاستور)

سرکارخانم دکتر صغری روحی (انستیتو پاستور)

جناب آقای دکتر سعید طالبی (دانشگاه ایران)

جناب آقای دکتر علی آهنی (آزمایشگاه مندل)

سرکارخانم دکتر پانته آ ایزدی (دانشگاه تهران)

سرکارخانم دکتر معصومه احمدیان (اداره ژنتیک)

سرکارخانم دکتر فائزه عزیزی (اداره ژنتیک)

سرکارخانم نفیسی (آزمایشگاه مرجع سلامت)

سرکارخانم دکتر رفعتی (موسسه ابن سینا)

جناب آقای دکتر کرامتی پور (دانشگاه تهران)

سرکارخانم دکتر مریمی (انستیتو پاستور)

جناب آقای دکتر گرشاسبی (انجمن ژنتیک پزشکی)

جناب آقای دکتر کریمی پور (انستیتو پاستور)

جناب آقای دکتر رشیدی نژاد (انجمن ژنتیک پزشکی)

سرکارخانم دکتر کریمی نژاد (آزمایشگاه ژنتیک پزشکی کریمی نژاد- نجم آبادی)

جناب آقای دکتر طباطبایی فر (دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)

جناب آقای دکتر نوروزی نیا (دانشگاه تربیت مدرس)

سرکارخانم دکتر داودی (انستیتو پاستور)

جناب آقای دکتر اکرمی (انجمن ژنتیک پزشکی)

سرکارخانم دکتر انجرازی (آزمایشگاه مرجع سلامت)

سرکارخانم دکتر خداوردیان (آزمایشگاه مرجع سلامت)  
جناب آقای دکتر اکبری (آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر اکبری)  
سرکارخانم دکتر صدرنبوی (دانشگاه علوم پزشکی اصفهان)  
سرکارخانم دکتر فرزانی (آزمایشگاه مرجع سلامت)  
جناب آقای دکتر عباس زادگان (دانشگاه علوم پزشکی مشهد)  
جناب آقای دکتر مهدیه (انجمن ژنتیک پزشکی)  
سرکارخانم دکتر باقرصاد (اداره ژنتیک)  
سرکارخانم دکتر حنطوش زاده (دانشگاه علوم پزشکی تهران)  
سرکارخانم دکتر پیری (دانشگاه علوم پزشکی تهران)  
سرکارخانم دکتر بهجتی (دانشگاه علوم بهزیستی)  
جناب آقای رفیعی (آزمایشگاه مرجع سلامت)

### **تحت نظارت فنی:**

**گروه استانداردسازی و تدوین راهنماهای سلامت**  
**دفتر ارزیابی فن آوری، استانداردسازی و تعرفه سلامت**  
**دکتر عبدالخالق کشاورزی، فرانک ندرخانی،**  
**دکتر مریم خیری، آزاده حقیقی**

## الف) عنوان دقیق خدمت مورد بررسی (فارسی و لاتین) به همراه کد ملی:

کد ملی ۸۰۵۰۷۹: qf-PCR

## ب) تعریف و تشریح خدمت مورد بررسی :

این سند به عنوان یک دستورالعمل جهت ارائه الگوی نحوه استفاده از کدهای کتاب ارزش نسبی خدمات سلامت، جهت تعریف استانداردهای تکنیک تشخیصی QF-PCR برای پزشکان درخواست کننده مجاز در آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی که سیستم مدیریت کیفیت مستقر نموده و پس از اعتبار بخشی، تأیید شده و یا جهت پذیرش ارجاعات تشخیص ژنتیک نظام سلامت منتخب شده اند، کارایی دارد. روسای آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی / مسئولین فنی آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی، جهت مدیریت صحیح هر تکنیک لازم است نکات ضروری این تکنیک را با توجه به الزامات استانداردهای ابلاغی آزمایشگاه مرجع سلامت با رویکرد انطباق با 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 داده ها مد نظر قرار گیرد.

## ت) موارد ضروری انجام مداخله تشخیصی (اندیکاسیون ها)

مرحله درخواست آزمایش ( کاربرد تکنیک QF-PCR )

۱. تشخیص سریع سندروم داون (تریزومی ۲۱)
۲. تشخیص سریع سندروم ادوارد (تریزومی ۱۸)
۳. تشخیص سریع سندروم پاتو (تریزومی ۱۳)
۴. غربالگری (و نه تشخیص) خیلی دقیق آنیوپلوئیدی های کروموزومهای جنسی و تعیین جنسیت

## ج) تواتر ارائه خدمت

### ج-۱) تعداد دفعات مورد نیاز

یک بار در هر بارداری براساس اندیکاسیون  
یک بار در کل زندگی فرد بیمار براساس اندیکاسیون

### ج-۲) فواصل انجام

ندارد

## د) افراد صاحب صلاحیت جهت تجویز (Order) خدمت مربوطه و استاندارد تجویز:

متخصص و فوق تخصص اطفال ، پریناتولوژیست، ارولوژیست، متخصصین زنان

## ه) ارائه کننده اصلی صاحب صلاحیت جهت ارائه خدمت مربوطه:

دانش آموخته دکتری تخصصی رشته ژنتیک پزشکی که صلاحیت او برای ارائه خدمت بر مبنای سطح بندی تخصصی احراز شده باشد.

## و) عنوان و سطح تخصص های مورد نیاز (استاندارد) برای سایر اعضای تیم ارائه کننده خدمت:

ردیف	عنوان رشته	تعداد مورد نیاز به طور استاندارد به ازای ارائه هر خدمت	مقطع تحصیلی	سابقه کار و یا دوره آموزشی مصوب در صورت لزوم	نقش در فرایند ارائه خدمت
۱	علوم آزمایشگاهی احراز صلاحیت شده و کلیه رشته های مرتبط	حداقل ۱ نفر	کارشناسی و بالاتر	-	کارشناس فنی

## ز) استانداردهای فضای فیزیکی و مکان ارائه خدمت:

آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی

روسای آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی / مسئولین فنی آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی ، جهت مدیریت صحیح تشخیص بیماری لازم است نکات ضروری مورد نیاز جهت تشخیص بیماری را با توجه به الزامات استانداردهای ابلاغی آزمایشگاه مرجع سلامت با رویکرد انطباق با 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 داده ها مد نظر قرار گیرد.

## ح) تجهیزات پزشکی سرمایه ای به ازای هر خدمت:

ترموسایکلر، نرم افزار آنالیز داده، فریزر ۲۰-، یخچال، کامپیوتر، سمپلر های متغیر، دستگاه Genetic analyzer در صورت نداشتن دستگاه Genetic analyzer، آزمایشگاه می تواند به برون سپاری بخش ژنوتایپینگ اقدام نماید.

## ط) داروها، مواد و لوازم مصرفی پزشکی جهت ارائه هر خدمت:

ردیف	اقلام مصرفی مورد نیاز	میزان مصرف (تعداد یا نسبت)
۱	کیت استخراج	به میزان مورد نیاز

به میزان مورد نیاز	کیت qf-PCR	۲
--------------------	------------	---

### ظ) اقدامات پاراکلینیکی، تصویربرداری و دارویی مورد نیاز جهت ارائه خدمت:

#### • مرحله پیش از انجام آزمایش

- آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی انجام دهنده بایستی دارای مسئول فنی ژنتیک با سیستم مدیریت کیفیت بر اساس استاندارد INSO-ISO-15189 باشد.
- آزمایشگاه پزشکی با دامنه فعالیت ژنتیک پزشکی ارسال کننده نمونه می بایست واجد شرایط مندرج در سند "دستورالعمل ارجاع نمونه ها جهت تشخیص بیماری های ژنتیک در نظام سلامت" به شماره HD-GO-00-MN-WI-001 باشد.
- آزمایشگاه هایی می توانند اقدام به انجام این تست نمایند که تجربه و توانایی انجام تست های مولکولی و سیتوژنتیکی دیگر را داشته باشند تا در صورت لزوم بتوانند از تست های تکمیلی جهت تایید نتایج QF-PCR استفاده نمایند.
- آزمایشگاه هایی که قصد انجام تشخیص پیش از تولد با استفاده از QF-PCR دارند باید تجربه قبلی انجام تشخیص های پیش از تولد را داشته باشند به گونه ای که توانایی مدیریت مشکلات رایج نظیر کم بودن حجم نمونه، کیفیت های مختلف نمونه ها، موزایسم و آلودگی با سلول های مادری را داشته باشند. همچنین این آزمایشگاه ها باید فرآیندهای کنترل کیفی سختگیرانه ای جهت کم کردن خطر جابجایی نمونه ها (sample mix-up) داشته باشند.
- تشخیص تریزومی های ۱۳، ۱۸ و ۲۱ باید به صورت روتین انجام شود و تعیین تعداد کروموزوم های جنسی می تواند در مواردی که خطر افزایش یافته اختلالات تعدادی کروموزوم های جنسی مطرح است انجام شود. یا بسته به سیاست های آزمایشگاه ها کروموزوم های جنسی را برای مواردی که QF-PCR جهت تشخیص تریزومی های ۱۳، ۱۸ و ۲۱ انجام می شود نیز انجام دهند.

#### ○ مرحله انجام آزمایش

آماده سازی نمونه ها:

۱. چنانچه کشت سلولی و کاریوتایپ انجام نمی شود توصیه می گردد که یک نمونه ذخیره (Back up) نیز نگهداری شود تا در صورت لزوم جهت تایید نتایج و یا انجام مجدد آزمایش استفاده گردد.
۲. آماده سازی نمونه ها (پاک کردن نمونه پرزهای جفتی یا توزیع مایع آمنیوتیک) باید منطبق بر استانداردهای صحیح انجام آزمایشات (Good laboratory practice; GLP) باشد. برای مثال در هر زمان تنها یک نمونه پروسس شود و برچسب گذاری (لیبلینگ) ظرف ها قبل از ریختن نمونه ها انجام نشود.
۳. پروتکل ها باید به گونه ای باشد که خطر جابجایی نمونه ها به حداقل برسد.

۴. تمامی موارد انتقال ظرف به ظرف حتما توسط فرد دیگری چک شود.

۵. هم چنین برای کلیه نمونه های مبتلا تایید شناسه نمونه و رد کردن جایجایی الزامی است.

نوع نمونه:

۱. مایع آمنیون: بین ۰/۵ تا ۴ میلی لیتر نیاز است.

۲. پرزهای جفتی: به منظور جلوگیری از تشخیص اشتباه به سبب **confined placental mosaicism** توصیه می شود که پرزهای جفتی به خوبی مخلوط و ریز شده و مقداری برداشته شود که به طور مکفی ترکیبی از مجموعه کل باشد. چنانچه مقدار کافی در دسترس نباشد بایستی توجه شود که احتمال موزایسیسم بررسی نمی شود و بایستی منشا جنینی نمونه تایید شود.

۳. خون: نمونه خون مادر برای تعیین احتمال آلودگی مادری برای نمونه های آغشته به خون مبتلا و همچنین نمونه های کم لازم است.

۴. **DNA**

استخراج **DNA**:

۱. استخراج **DNA** بایستی به گونه ای انجام شود که کمترین جایجایی لوله را داشته باشد و در کمترین زمان ممکن حاضر گردد.  
۲. با توجه به محدودیت نمونه در موارد تشخیص پیش از تولد و خطرات ناشی از نمونه گیری مجدد، توصیه می شود آزمایشگاه ها از روش هایی جهت استخراج **DNA** استفاده نمایند که میزان زیاد **DNA** با خلوص بالا از حجم کم نمونه بدهند. بدین منظور آزمایشگاه ها می توانند از روش های خانگی استفاده نمایند هر چند که استفاده از کیت های تجاری معتبر توصیه می شود. اطمینان از عملکرد صحیح کیت یا روش های خانگی بر عهده آزمایشگاه انجام دهنده می باشد.

انتخاب مارکرها:

۱. برای کروموزوم **X** و هر یک از کروموزوم اتوزوم حداقل ۴ مارکر باید بررسی گردد. حداقل ۲ مارکر اختصاصی کروموزوم **Y** (**AMEL**) یا نواحی مشابه جهت تعیین نسبت **X** و **Y**). هم چنین استفاده از یک مارکر شمارشی روی کروموزوم **X** مانند توالی های **TAF9** برای تعیین تعداد کروموزوم های **X** توصیه می شود. این توالی به صورت همزمان توسط یک جفت پرایمر از روی کروموزوم **X** و کروموزوم اتوزوم تکثیر می شود و با توجه به اندازه متفاوت محصولات جهت تعیین تعداد کروموزوم **X** استفاده می شود.

۲. اصول اولیه طراحی **multiplex** بایستی رعایت شود از جمله رعایت استفاده از پرایمرهای بزرگتر از ۲۲ bp که با توالی های تکراری و **SNP** همولوژی نداشته و فاقد اثر متقابل **primer-dimer** باشند. استفاده از مارکرهای **tri-tetra-penta-hexanucleotide** توصیه میشود فقط در مواردیکه مارکرهای مناسب در منطقه وجود نداشته باشد میتوان از **dinucleotide marker** استفاده نمود.

۳. مارکرهای مورد استفاده بایستی در جامعه دارای هتروزیگوسیتی بالا باشند. قبل از استفاده از هر مارکری که تا به حال برای بررسی اختلالات تعدادی استفاده نشده اند لازم است که در ۱۰۰ کروموزوم جمعیت جهت تعیین هتروزیگوسیتی و رد کردن پلی مورفیسم جمعیتی مورد بررسی قرار بگیرد.

۴. در مجموع استفاده از کیت های معتبر بین المللی یا داخلی با مجوز تشخیص آزمایشگاهی توصیه می شود.

## انجام PCR

۱. جهت انجام PCR استفاده از کیت های معتبر بین المللی یا داخلی که مجوز تشخیص آزمایشگاهی (IVD) داشته باشند الزامی است.

۲. در هر راه اندازی PCR باید نمونه کنترل آب مقطر (کنترل بدون DNA) همراه با نمونه های DNA دیگر استفاده گردد تا آلودگی مواد و واکنش ها با DNA یا محصولات PCR مشخص گردد.

۳. در خصوص جزئیات مربوط به انجام آزمایش و صحت گذاری روش آزمایش می بایست برابر دستورالعمل شرکت سازنده اقدام گردد.

## آنالیز نتایج

۱. دستگاه **Genetic analyzer** از دستگاه هایی که قابلیت تفکیک (رزولوشن) ۲bp داشته باشند و بتوانند هم ارتفاع پیک و هم سطح زیر منحنی را حساب نمایند، می توان بدین منظور استفاده کرد. سایر ویژگی ها باید منطبق بر آخرین ویرایش دستورالعمل های مورد اتفاق نظر مانند دستورالعمل منتشر شده از سوی ACC/CMGS ذکر شده در قسمت منابع بند ۳-۴ باشد.

۲. تفسیر محصولات **QF-PCR**: تفسیر نتایج محصولات QF-PCR باید بر اساس آخرین ویرایش دستورالعمل های مورد اتفاق نظر مانند دستورالعمل منتشر شده از سوی ACC/CMGS ذکر شده در قسمت منابع بند ۳-۴ انجام گیرد.

## ی) استانداردهای گزارش :

- زمان جوابدهی در ۹۷٪ موارد باید قبل از ۳ روز کاری باشد.
- با توجه به بازه های تعیین شده بر اساس آخرین ویرایش دستورالعمل منتشر شده از سوی ACC/CMGS، نتیجه بررسی هر کروموزوم به صورت طبیعی، غیر طبیعی و حدواسط گزارش می شوند.
- در موارد حد واسط که علل آن در گایدلاین فوق آمده است نتیجه تست **Inconclusive** است و بایستی مجدد تکرار و یا با تکنیک دیگری به نتیجه رسانده شود.

مرحله تفسیر بالینی

در مواردی که نتایج مثبت (غیر طبیعی) باشند، اقدامات زیر ضروری است:



۱. بررسی نمونه مادر به روش QF-PCR با همان مارکرها به منظور یافتن مارکهای مشترک مادر و جنین و تایید صحت تعلق نمونه جنین به مادر

۲. تکرار مجدد تمامی مراحل آزمایش (شامل استخراج DNA) از روی نمونه ذخیره.

۳. انجام تست تکمیلی دیگر (FISH یا MLPA یا کاریوتایپ) با استفاده از بخش های دیگر نمونه.

در موارد غیر طبیعی انجام تست های تکمیلی لازم است. بدین منظور می توان با تکنیک دیگری مانند کاریوتایپ یا FISH که cell based هستند و یا تکنیک مولکولی در صورتی که بر روی نمونه اولیه و ( نه روی DNA به دلیل احتمال جابجایی نمونه) صورت گیرد.

آلودگی با سلول های مادری

نمونه ممکن است به وضوح خونی باشد و ظن آلودگی مادری را مطرح کند

- در این موارد لازم است بیمار نسبت به احتمال عدم جوابدهی مطلع شود و همچنین آزمایشگاه موظف است تدابیری برای شرایط عدم جوابدهی داشته باشد مانند انجام تست FISH در شرایط نیاز به جواب سریع و یا کاریوتایپ و سایر موارد.

- تعیین جنسیت و بررسی و مقایسه با مارکر های خون مادر برای تمام جنین های دختر الزامی است. چنانچه خون مادر در دسترس نباشد تست انجام نشود.

پس از بررسی نتایج در صورتی که احتمال آلودگی مادری مطرح شود بررسی مارکر های مادری الزامی است.

موزایسم

در مواردی که به وضوح موزایسم مشاهده می شود بهتر است که با توصیه به بررسی های بیشتر، گزارش انجام شود.

**گ) شواهد علمی در خصوص کنتراندیکاسیون های دقیق خدمت:**

ندارد

**ل) مدت زمان ارائه هر واحد خدمت:**

سه روز ( در تشخیص ژنتیک پیش از تولد) تا حداکثر دو هفته ( در تشخیص ژنتیک فرد بیمار)

**ف) موارد ضروری جهت آموزش به بیمار:**

نتایج به دست آمده باید توسط پزشک مشاور ژنتیک یا پزشک متخصص برای افراد مشاوره جو توضیح داده شود.

**منابع:**

۱. استاندارد INSO-ISO-15189

۲. کتاب "مجموعه ای از مستندات سیستم مدیریت کیفیت در آزمایشگاه پزشکی" (آزمایشگاه مرجع سلامت- انجمن آسیب شناسی ایران)، چاپ دوم، سال ۱۳۹۱.

۳. آیین نامه مستند سازی، شماره گذاری، کنترل مدارک، بازنگری و نحوه صدور به شماره HD-GO-00-MN-RE-001.

۴. Association for Clinical Cytogenetics and Clinical Molecular Genetics Society.

- تاریخ اعتبار این راهنما از زمان ابلاغ به مدت ۲ سال می باشد و بعد از اتمام مهلت زمانی میبایست ویرایش صورت پذیرد.