



Genomika i opieka perinatalna

JOANN BODURTHA, MD, MPH, JEROME F. STRAUSS III, MD, PhD

N Engl J Med 2012;366:64-73

W okresie perinatalnym zarówno wśród przyszłych rodziców, jak i pracowników opieki zdrowotnej pojawiają się obawy natury genetycznej i społecznej. Dzięki postępowi w dziedzinie genomiki i metodach rozrodu wspomaganego medycznie naprzeciw tym obawom wychodzą nowe metody wykrywania zaburzeń genetycznych i podatności na choroby u płodu, możliwe do zastosowania na różnych etapach opieki perinatalnej. Pojawiające się metody leczenia chorób monogenowych mogą nadać temu zagadnieniu nowy wymiar.

Lekarzy mających pod opieką osoby planujące ciążę zachęca się do zbierania od tych pacjentów wywiadu rodzinnego oraz danych genetycznych, dzięki którym będą mogli udzielić informacji na temat dostępnych badań wykrywających nosicielstwo chorób genetycznych opartych na swoistych dla konkretnej populacji czynnikach ryzyka,¹ a w razie konieczności skierować pacjentów do specjalistów zajmujących się genetyką i ciążą dużego ryzyka. Na świecie obserwuje się duże różnice w przyswajaniu i wdrażaniu edukacji genetycznej i praktyk badań przesiewowych przez podmioty świadczące usługi zdrowotne, kobiety i ich partnerów oraz systemy ubezpieczeń zdrowotnych.^{2,3} Różnic tych należy się spodziewać, ponieważ wynikają one z różnego dostępu do opieki zdrowotnej oraz różnej dostępności poradnictwa genetycznego i diagnostyki genetycznej.

Możliwości badań genetycznych wciąż się poszerzają. Nawet w najkorzystniejszym scenariuszu pacjenci, lekarze i osoby odpowiedzialne za politykę zdrowotną muszą stanąć przed skomplikowanym wyborem, które techniki genetyczne powinno się stosować szeroko, a które w przypadkach indywidualnej oceny zwiększonego ryzyka,

oraz określić, w jakim stopniu wyniki badań laboratoryjnych powinny wpływać na podejmowanie tych decyzji.⁴ Na przykład nie zawsze można przewidzieć *a priori* stopień ciężkości stanu klinicznego na podstawie genotypu. Wynik badania laboratoryjnego stwierdzający mutację może być poprawny, ale zidentyfikowana mutacja genetyczna może nie powodować choroby (tzn. jest to wariant genetyczny o nieokreślonym znaczeniu). Ponadto odkryta mutacja lub wariant w znanym genie konkretnej choroby może nie korelować z fenotypem ze względu na wpływ czynników modyfikujących, które mogą mieć charakter genetyczny, epigenetyczny lub środowiskowy.

Diagnostyka genetyczna i badania przesiewowe przed poczęciem

Jeśli to możliwe, ryzyko genetyczne, zwłaszcza związane ze znaną chorobą genetyczną, która występuje w rodzinie lub wystąpiła w poprzedniej ciąży, powinno być oceniane przed poczęciem lub, w kontekście zapłodnienia pozaustrojowego, przed zainicjowaniem ciąży. Przesiewowe badania genetyczne w kierunku konkretnych chorób (lub grup chorób) proponowane są indywidualnym pacjentom, grupom lub całym populacjom. Obciążony wywiad rodzinny nie jest konieczny, aby para kwalifikowała się do badania przesiewowego. Diagnostyka genetyczna prowadzona jest wtedy, gdy zachodzi podejrzenie, że u konkretnej osoby występuje zwiększone ryzyko genetyczne ze względu na wywiad rodzinny lub dodatni wynik biochemicznego badania przesiewowego.

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) zaleca, aby udzielać kobietom informacji na temat ryzyka genetycznego, włączając ryzyko nosicielstwa zmutowanych alleli odpowiedzialnych za wystąpienie mukowiscydozy, hemoglobinopatii oraz chorób typowych dla populacji Żydów, których przodkowie pochodzili z Europy Wschodniej.^{1,5-10} American College of Medical Genetics (ACMG) dla tej populacji zaleca szerszy panel badań przesiewowych, poza tym wszystkim parom, bez względu na rasę czy pochodzenie etniczne, proponuje badanie w kierunku rdzeniowego zaniku mięśni.¹¹⁻¹⁶ Identyfikacja

McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore (J.B.); Department of Obstetrics and Gynecology, Virginia Commonwealth University, Richmond (J.F.S.). Adres do korespondencji: Dr Jerome F. Strauss, Department of Obstetrics and Gynecology, Virginia Commonwealth University, 1101 E. Marshall St., Richmond, VA 23298; e-mail:jfstrauss@vcu.edu.

Artykuł pochodzi z działu „Medycyna genomowa”, którego redaktorami są: W. Gregory Feero MD, PhD oraz Alan E. Guttmacher MD.

Słowniczek

Amplifikacja: powielenie danej sekwencji DNA w wielu kopiach, zwykle przez zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy.

Aneuploidia: zaburzenie liczby chromosomów w postaci jednej lub więcej dodatkowych kopii lub utraty chromosomu, prowadzące do nierównoważonej ilości materiału genetycznego lub liczba chromosomów niebędąca zwielokrotnieniem podstawowej liczby haploidalnej.

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (array CGH): technika umożliwiająca wykrywanie niedoboru lub nadmiaru DNA w całym genomie, niewymagająca wcześniejszej znajomości konkretnego zaburzenia w chromosomach.

Translokacja zrównoważona: zmiana lokalizacji jednego lub kilku segmentów danego chromosomu, niewpływająca na całkowitą ilość materiału genetycznego w komórkach somatycznych lub gametach.

Zmienność liczby kopii: różnice między poszczególnymi osobami w liczbie kopii konkretnego genu lub sekwencji DNA. Pełne znaczenie zmienności liczby kopii dla chorób występujących u człowieka nie jest znane.

Zmiany epigenetyczne: zmiana w regulacji ekspresji genu i jego aktywności bez zmiany struktury genu.

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*: technika laboratoryjna pozwalająca na wykrywanie i lokalizację swoistych sekwencji DNA na chromosomach. Polega na inkubacji badanego materiału z małymi cząsteczkami DNA – sondami genetycznymi, które są oznakowane cząsteczką fluorescencyjną. Sonda wiąże się z odpowiadającą jej sekwencją na chromosomie na zasadzie komplementarności.

Badania związku całego genomu, badania asocjacyjne całego genomu: metoda stosowana w badaniach genetycznych w celu poszukiwania związku między swoistą zmiennością genetyczną (zwykle setki tysięcy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów) a konkretnymi chorobami.

Heterozygotyczność: obecność różnych alleli w jednym lub więcej loci chromosomów homologicznych (sparowanych).

Reakcja łańcuchowa polimerazy: technika laboratoryjna wykorzystywana do amplifikacji DNA. Krótkie, zsyntezowane sekwencje DNA komplementarne do określonych regionów genu nazywane primerami stosowane są do wyodrębnienia fragmentu genomu, który ma zostać powielony. Temperatura reakcji jest na zmianę podwyższana i obniżana, co ułatwia kopiowanie wybranej sekwencji DNA przez enzym replikujący. Technika ta pozwala na uzyskanie milionów kopii danej sekwencji w kilka godzin.

Primer: cząsteczka (w postaci krótkiego łańcucha RNA lub DNA), której obecność jest konieczna do stworzenia innej cząsteczki (w postaci dłuższego łańcucha DNA).

Sonda: swoista, prefabrykowana sekwencja DNA lub RNA, oznakowana jedną z kilku metod i wykorzystywana do wykrywania komplementarnych sekwencji przez wiązanie się z nimi.

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu: zmienność dotycząca pojedynczego nukleotydu w sekwencjach DNA, powszechna forma zmienności w ludzkim genomie.

Frakcjonowanie na podstawie wielkości: separacja cząsteczek DNA na podstawie długości poszczególnych sekwencji nukleotydów.

Sekwencjonowanie całego genomu: określenie pierwotnej sekwencji nukleotydów całego genomu danego organizmu.

nosicieli recesywnych chorób autosomalnych oraz chorób sprzężonych z chromosomem X jeszcze przed poczęciem pozwala parom na bardziej świadome podejmowanie decyzji reprodukcyjnych.

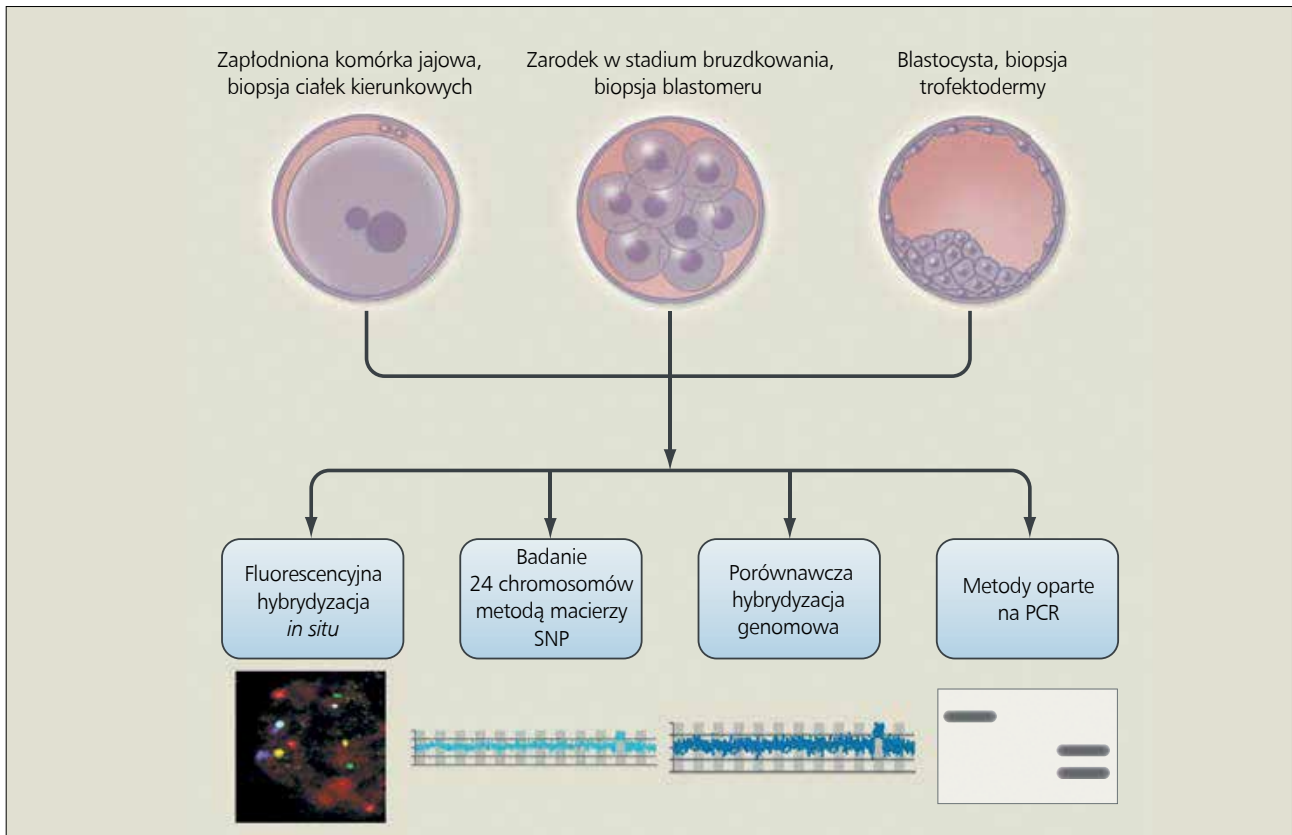
W zależności od tego, czy materiałem do badania przesiewowego są chromosomy, białka, produkty powiązane z genem (np. RNA) czy jądrowe albo mitochondrialne DNA, wykorzystuje się różne metody. Obecnie skринing nosicieli obejmuje badania najczęściej występujących mutacji i chorób swoistych dla danej populacji. Postęp, jaki dokonał się ostatnio w metodach sekwencjonowania DNA oraz w bioinformatyce, umożliwił opracowanie metody identyfikacji nosicieli mutacji odpowiedzialnych za ponad 400 znanych chorób recesywnych.¹⁷ Stosując tę metodę, można jednak przeoczyć niektóre mutacje i nie wykryć wszystkich nosicieli.

W przypadku badania przesiewowego wykrywającego nosicieli choroby Taya-Sachsa (niedobór heksaminidazy, najczęściej występujący u Żydów, których przodkowie pochodzą z Europy Wschodniej), podstawową metodą skринingową pozostaje test aktywności heksaminidazy, gdyż wykazuje on większą czułość niż analiza DNA ukierunkowana na konkretne mutacje. (Badanie przesiewowe w kierunku trzech najczęstszych mutacji genu heksami-

dazy wykrywa 92-94% nosicieli¹⁸). Obecnie stosowane są testy genetyczne oparte na mniej czułej strategii mającej na celu wykrycie mutacji prowadzącej do choroby Taya-Sachsa, które symultanicznie wykrywają obecność mutacji odpowiedzialnych za inne choroby genetyczne stanowiące ryzyko dla tej populacji, zatem oferują szerszy zakres wykrywanych chorób, kosztem niższej czułości wykrycia nosiciela choroby Taya-Sachsa. Z tego powodu lekarze zlecający badania przesiewowe powinni posiadać wiedzę na temat aktualnych zaleceń towarzystw naukowych i po poinformowaniu o czułości i swoistości badania uzyskać na nie świadomą zgodę, a w przypadku niejasnych wyników wiedzieć, gdzie powinni skierować pacjenta.

Przedimplantacyjny skринing genetyczny

Przedimplantacyjny skринing genetyczny stosowany jest w celu zwiększenia skuteczności leczenia metodami rozrodu wspomaganego medycznie przez wybór odpowiednich zarodków do transferu do jamy macicy (ryc. 1, grafika interaktywna dostępna wraz z pełnym tekstem artykułu na stronie NEJM.org). Analizie genetycznej poddawane są jeden lub dwa blastomery pobrane mikrochirurgicznie z zarodka w trzecim dniu hodowli. Wyniki otrzymuje się na



RYCINA 1 Metody przedimplantacyjnego skринingu genetycznego i genetycznej diagnostyki przedimplantacyjnej.

Materiał uzyskiwany jest przez mikrochirurgiczne pobranie ciałek kierunkowych, blastomerów lub trofektodermi. Procedura biopsji zasadniczo nie wpływa na potencjał rozwojowy zapłodnionych komórek jajowych i zarodków. W zależności od materiału i zastosowanej metody badawczej wyniki uzyskiwane są na tyle szybko, że wybrane zarodki przenoszone są do macicy bez konieczności ich mrożenia w oczekiwaniu na zakończenie analizy genetycznej. Materiał maczyny (ciałka kierunkowe, aby określić status genetyczny komórki jajowej konieczna jest ocena obu ciałek) oraz genetyczny status zarodka (biopsja blastomeru i trofektodermi) można analizować wieloma różnymi metodami dającymi informację na temat chromosomów płci, liczby kopii pozostałych chromosomów oraz ich zmian strukturalnych. Metody te obejmują fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (fluorescent hybridization *in situ*, FISH), macierze wykorzystujące metody polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (single-nucleotide-polymorphism, SNP) pozwalające na analizę 24 chromosomów oraz porównawczą hybrydyzację genomową do mikromacierzy. Metoda FISH pozwala na ocenę ograniczonej liczby chromosomów. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy oraz macierze SNP dają możliwość oceny liczby kopii chromosomów i ich zmian. Dodatkowo metodą macierzy SNP można zidentyfikować istotną klinicznie disomię jednorodzielską, pokrewieństwo oraz zrównoważone translokacje. Swoiste mutacje genów identyfikowane są metodami opartymi na reakcji łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction, PCR). W przypadku chorób dziedziczonych zgodnie z genetyką mendlowską rozpoznanie można ustalić w $\geq 80\%$ przypadków. Niemożność uzyskania diagnozy wynika najczęściej z zanieczyszczenia materiału lub jego nieudanej amplifikacji. Jeżeli jednak uda się rozpoznać chorobę monogenową, prawdopodobieństwo, że rozpoznanie jest błędne, jest minimalne.

tyle szybko, że wybrane zarodki mogą zostać przeniesione do jamy macicy w piątym dniu hodowli lub zostać zamrożone i użyte do transferu w przyszłości. Nieprawidłowości chromosomowe wykrywane są przy zastosowaniu fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (fluorescent in situ hybridization, FISH) wykorzystującej fluorescencyjnie znakowane sondy wiążące się z płodowym DNA w jądrach interfazowych (patrz słowniczek). Przedimplantacyjny skринing genetyczny stosowany jest w przypadkach zaawansowanego wieku matki, nawracających niepowodzeń implantacji, idiopatycznych poronień nawracających, a także aby poprawić wskaźniki ciąży w przypadkach transferów pojedynczych zarodków.¹⁹⁻²¹

W zarodkach ludzkich będących na etapie bruzdkowania obserwuje się duży stopień mozaicyzmu, co może utrudniać interpretację wyników i wymagać ponownej analizy na dalszych etapach rozwoju. Z kolei aktualnie stosowane metody FISH uniemożliwiają analizę wszystkich chromosomów w stopniu, jaki jest konieczny, jeśli genetyczny skринing przedimplantacyjny ma poprawić wskaźnik uzyskiwanych ciąży, zatem debata na temat przydatności tej metody wciąż trwa. Stąd skринing genetyczny oparty na metodzie FISH aktualnie nie jest zalecany w przypadku wskazań wymienionych powyżej (tj. zaawansowany wiek matki, powtarzające się niepowodzenia implantacji, idiopatyczne poroniecia nawracające oraz poprawa

TABELA 1

Choroby jednogenowe często identyfikowane w trakcie genetycznej diagnostyki przedimplantacyjnej

Choroby	Geny
Dominujące	
Choroba Huntingtona	<i>HTT</i>
Dystrofia miotoniczna	Typ 1, <i>DMPK</i> ; typ 2, <i>ZNF9 (CNBP)</i>
Choroba Charcota-Mariego-Tootha	Typ 1A, <i>PMP22</i>
Recesywne	
β-talasemia	<i>HBB</i>
Mukowiscydoza	<i>CFTR</i>
Rdzeniowy zanik mięśni (choroba Werdniga-Hoffmana)	<i>SMN1</i>
Niedokrwistość sierpowatokrwinkowa	<i>HBB</i>
Sprzężone z płcią	
Zespół łamliwego chromosomu X	<i>FMR1</i>
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	<i>DMD</i>
Hemofilia	Typ A, <i>F8</i> ; typ B, <i>F9</i>

wskaźników ciąży w przypadkach transferu pojedynczego zarodka).²² Poprawę wyników leczenia metodą zapłodnienia pozaustrojowego może przynieść analiza ciałek kierunkowych wykrywająca zaburzenia genetyczne pochodzenia matczynego obecne w komórkach jajowych, włączając błędy zachodzące w czasie podziału mejotycznego prowadzące do aneuploidii. Nowsze metody oparte na technologii mikromacierzy, włączając mikromacierze wykorzystujące polimorfizm pojedynczych nukleotydów (single-nucleotide-polymorphism, SNP) pozwalające na analizę 24 chromosomów (kariotypowanie wirtualne), dostarczają więcej informacji genetycznej i prawdopodobnie zastąpią FISH.²³ Ta technologia ma szansę zwiększyć kliniczne zastosowanie przedimplantacyjnego skriningu genetycznego.

Przedimplantacyjna diagnostyka genetyczna

Przedimplantacyjna diagnostyka genetyczna, wprowadzona w 1990 roku, pozwala na wybór do transferu zarodka pozbawionego choroby genetycznej.²⁴ Analiza genetyczna przeprowadzana jest podobnie jak w przypadku przedimplantacyjnego skriningu genetycznego. W celu wykrycia chromosomów płci i swoistych zaburzeń pozostałych chromosomów stosowana jest metoda FISH, natomiast w diagnostyce molekularnej opartej na amplifikacji DNA wykorzystywana jest metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (polymerase chain reaction, PCR). Odnotowano narodziny pierwszego dziecka po zastosowaniu przedimplantacyjnej diagnostyki genetycznej z wykorzystaniem porównawczej hybrydyzacji genomowej i techniki mikromacierzy.²⁵ Możliwe jest także wykrywanie mutacji DNA mitochondrialnego pod warunkiem,

że przeważają one w puli tego rodzaju DNA.²⁶ Analiza pierwszego i drugiego ciała kierunkowego pozwala wykryć mutacje w materiale genetycznym pochodzenia matczynego (tj. choroby sprzężone z chromosomem X oraz choroby autosomalne dominujące), włączając nosicielstwo dystrofii mięśniowej Duchenne'a, zespołu nietrzymania barwnika (incontinentia pigmenti) oraz neurofibromatozy typu 2.²⁷

Główne choroby monogenowe o charakterze dominującym recesywnym i sprzężonym z chromosomem X, dla których stosowana jest przedimplantacyjna diagnostyka genetyczna, wymieniono w tabeli 1. Przy zastosowaniu współczesnych metod diagnostyka chorób dziedzicznych zgodnie z prawami Mendla jest bardzo dokładna, wskaźnik błędnych wyników nie przekracza 1%.²⁸ Błędy diagnostyczne przypisywane są błędom laboratoryjnym, włączając transfer niewłaściwego zarodka, zanieczyszczenie próbki materiałem pozazarodkowym, nieudaną amplifikację metodą PCR jednego z alleli (tzw. allele dropout), zastosowanie nieprawidłowych sond genetycznych lub niewłaściwych zestawów primerów oraz mozaicyzm chromosomów.

Dostępność przedimplantacyjnej diagnostyki genetycznej w Stanach Zjednoczonych i Europie jest coraz szersza. Niemniej jednak jej zastosowanie jest względnie słabo regulowane, mimo że profesjonalne towarzystwa lekarskie, American Society for Reproductive Medicine (ASRM) oraz European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), opracowały wytyczne i zaleciły akredytację laboratoriów wykonujących taką diagnostykę genetyczną.^{29,30}

Prenatalna diagnostyka genetyczna i genomowa

Podstawowe ryzyko jakiegokolwiek wady wrodzonej dla wszystkich ciąży wynosi 3-4%. Stopień ciężkości wad wrodzonych różni się znacznie, odzwierciedlając szeroki wachlarz dziedziczonych mutacji i wariantów genetycznych, spontanicznych mutacji powstających w gametach, zarodkach lub u płodu, zmian epigenetycznych oraz nakładający się wpływ środowiska. Czynniki matczyne zwiększające ryzyko posiadania dziecka z chorobą lub wadą genetyczną obejmują zaawansowany wiek, choroby, takie jak cukrzyca i otyłość, ekspozycję na czynniki teratogenne, takie jak alkohol oraz zakażenia wirusowe.

Współcześnie stosowana genetyczna diagnostyka prenatalna wymaga pobrania próbki zawierającej komórki płodu przez biopsję kosmówki pod kontrolą ultrasonograficzną z dostępu przezpochwowego lub przez powłoki brzuszne wykonaną między 10 a 14 tygodniem ciąży lub też pobrania płynu owodniowego zawierającego złuszczone komórki płodu około 15 tygodnia ciąży (amniopunkcja) oraz hodowli tych komórek. Diagnostyka prenatalna w postaci biopsji kosmówki lub amniopunkcji jest opcją postępowania

TABELA 2

Genomowe badania wykonywane w okresie perinatalnym

Rodzaj badania*	Kosmki kosmówki	Amniocyty	Jądrowe komórki płodowe	Pozakomórkowe płodowe DNA/RNA	Ciałka kierunkowe	Biopsja blastomeru lub blastocysty	Możliwość analizy całego genomu†
Kariotyp (cytogenetyczny)	Tak	Tak	Nie	Nie	Nie	Nie	Tak
FISH	Tak	Tak	Tak	Nie	Tak	Tak	Nie
Ilościowa PCR	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Nie
SNP lub porównawcza hybrydyzacja genomowa do macierzy	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak
Równoległe sekwencjonowanie dużej liczby fragmentów DNA	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak
Sekwencjonowanie eksomu lub całego genomu	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak
Wykrywanie mutacji	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Nie

*Wymieniono techniki, które są stosowane lub nadają się do zastosowania w genetycznej diagnostyce okresu perinatalnego. FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy, SNP – polimorfizm pojedynczych nukleotydów.
 †Analiza całego genomu (genomewide analysis) obejmuje porównawczą hybrydyzację genomową, badanie 24 chromosomów metodą macierzy SNP, sekwencjonowanie całego eksomu i sekwencjonowanie całego genomu.

nia w ciąży dużego ryzyka. Procedury te pociągają za sobą około jednoprocetowe lub mniejsze ryzyko poronienia. Informację uzyskaną drogą tradycyjnego badania cytogenetycznego lub analizy metodą FISH kosmówki lub uzyskanych w hodowli komórek płodu można uzupełnić badaniami techniką macierzy DNA, włączając porównawczą hybrydyzację genomową do mikromacierzy i macierze SNP. Te metody są w stanie wykryć zmienność genetyczną i nieprawidłowości, które zwykle są niewykrywalne metodami cytogenetycznymi o niskiej rozdzielczości, włączając zmienność liczby kopii danego genu.³¹

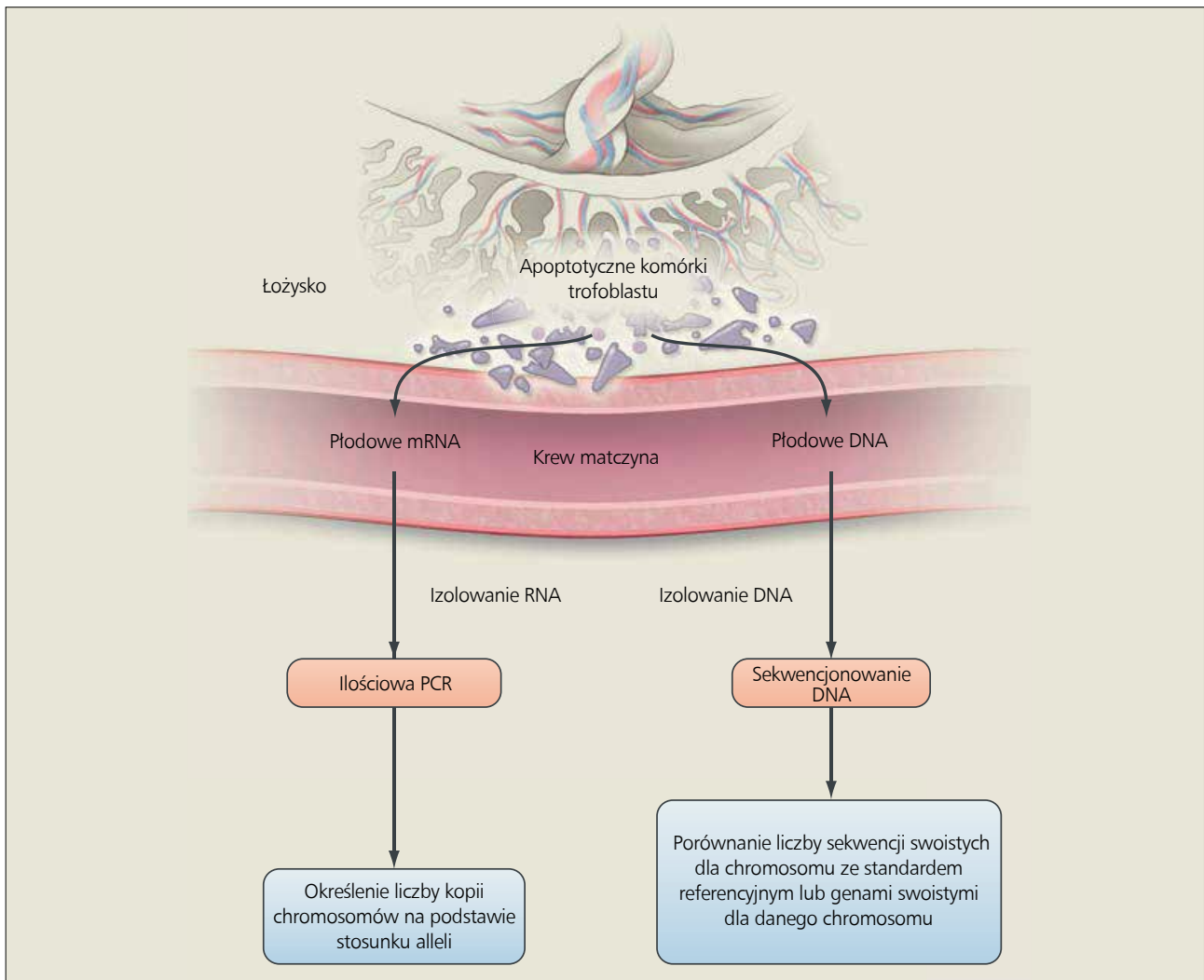
Informacja na temat liczby kopii konkretnego genu może być przydatna w przypadkach stwierdzenia wartości związanej z występowaniem danej choroby, jednak w większości przypadków kliniczne znaczenie wielkości tych powtórzeń nie jest znane. Wiele chorób jest heterogennych genetycznie, część przypadków spowodowanych jest pewną liczbą powtórzeń kopii genu, pozostałe związane są z innymi czynnikami. Techniki laboratoryjne wykorzystujące macierze DNA będą prawdopodobnie coraz szerzej stosowane w diagnostyce genetycznej i obecnie trwa debata dotycząca właściwego zastosowania tych metod, zwłaszcza w diagnostyce prenatalnej. Wytyczne zaproponowane przez ACOG i inne medyczne towarzystwa naukowe będą z czasem ewoluowały.³²

Stwierdzenie wady płodu w badaniu ultrasonograficznym stwarza okazję do omówienia z rodziną możliwości

wykrycia genetycznego tła malformacji. Zastosowanie diagnostyki genetycznej i genomowej w takich sytuacjach powinno być jednak rozważone pod kątem kosztów i ewentualnych trudności w interpretacji wyników, zwłaszcza jeśli w rodzinie nie przeprowadzono dotychczas diagnostyki genetycznej, której wyniki mogłyby ułatwić tę interpretację.

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna

Od dawna wiadomo, że jądrowe komórki płodu przedostają się do krążenia matki, jednak próby izolacji tych komórek z krwi matki (znajdujących się tam zwykle w liczbie 1-6/ml) i wykorzystanie ich do celów diagnostyki genetycznej nie przynosiły oczekiwanych rezultatów ze względu na małą czułość. Pozakomórkowe płodowe RNA i DNA, uwalniane z komórek trofoblastu ulegających apoptozie (nie z komórek płodowych jako takich), w świetle ostatnio dokonanego postępu w metodach sekwencjonowania DNA i informatyce, wydają się bardziej obiecującym źródłem materiału dla badań genetycznych (tab. 2).^{33,34} W 2007 roku wykryto u płodu zespół Downa, stosując ilościowe badanie krwi matczynej w kierunku obecności pozakomórkowego RNA dla *PLAC4*,³⁵ swoistego dla trofoblastu genu zlokalizowanego w regionie chromosomu 21 odpowiedzialnego za wystąpienie tego zespołu



RYCINA 2

Nieinwazyjna diagnostyka prenatalna z wykorzystaniem osoczowego pozakomórkowego RNA lub DNA płodowego obecnego we krwi matki, pochodzącego z obumarłych komórek trofoblastu tworzącego łożysko.

W przypadku pozakomórkowego RNA płodowego docelowe cząsteczki RNA zawierające SNP oceniane są ilościowo przy użyciu metody PCR. Stosunek ilościowy alleli, określany za pomocą ilościowej PCR, wykorzystywany jest do określenia liczby kopii chromosomu w przypadku, kiedy płód jest heterozygotą dla SNP. W przypadku euploidii oczekiwany stosunek amplifikowanych alleli wynosi 1:1, natomiast proporcja 2:1 wskazuje na trisomię. Pozakomórkowe płodowe DNA w osoczu może być bezpośrednio sekwencjonowane, ponieważ jest mniejsze niż matczyne DNA pozakomórkowe, poza tym przed analizą sekwencji może zostać „zagęszczone” drogą frakcjonowania na podstawie wielkości cząsteczek. Liczba swoistych sekwencji charakterystycznych dla danego chromosomu może być porównana z próbką referencyjną lub z innym chromosomem jako swoim denominatorem w próbce, co pozwala wykryć zmienność w liczbie chromosomów lub ich zmiany strukturalne. Opisano dodatkowe metody analizy pozakomórkowego DNA płodowego w celu określenia liczby chromosomów, między innymi metody ilościowej oceny odmiennie metylowanych regionów określonych chromosomów płodu przy użyciu PCR. Te metody oczekują na walidację.

(ryc. 2).³⁶ Sekwencja kodująca *PLAC4* ma takie SNP, które w przypadku, kiedy płód jest heterozygotą, pozwalają na określenie stosunku alleli względem siebie. W zarodkach euploidalnych stosunek ten wynosi 1:1. Stosunek 2:1 wskazuje na duże prawdopodobieństwo trisomii 21. Analiza mRNA kodowanego przez różne geny zlokalizowane na chromosomie 21 mogłaby poprawić czułość tej metody, dotychczas jednak nie była szerzej stosowana.

Pozakomórkowe DNA płodu jest obecnie materiałem z wyboru dla celów nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej. DNA płodowe reprezentuje 3-6% krążącego DNA pozakomórkowego obecnego w osoczu matki i można je wykryć w pierwszym trymestrze ciąży. Jego ilość rośnie wraz z powiększaniem się łożyska. Fragmenty pozakomórkowego DNA płodu są znacznie mniejsze niż fragmenty pozakomórkowego DNA matki, co ułatwia sekwencjonowanie.

wanie. Chociaż płodowe DNA można wykryć już na etapie 5 tygodnia ciąży, metody analizy stają się wiarygodne dopiero po 7 tygodniu ciąży.

Obecność chromosomu Y determinuje płęć męską, zatem na podstawie jego obecności lub nie we krwi matki można wnioskować o płęć płodu. W najświeższym artykule przeglądowym i metaanalizie³⁷ poświęconej określaniu płęć płodu na podstawie badania pozakomórkowego płodowego DNA izolowanego z krwi matki po 7 tygodniu ciąży odnotowano bardzo dobre, ale nie doskonałe, wyniki. Największą czułość i swoistość badania sekwencji swoistych dla chromosomu Y w celu określenia płęć płodu uzyskuje się po 20 tygodniu ciąży, kiedy do tego celu z powodzeniem wystarcza badanie ultrasonograficzne.

Oprócz określenia płęć płodu u ciężarnej Rh ujemnej na podstawie badania ojcowskiego materiału w pozakomórkowym DNA płodu można z dużą dokładnością określić status płodu w aspekcie antygenów układu Rh. Tę strategię można zastosować także w celu wykrycia przenoszonych przez ojca chorób monogenowych dziedziczonych autosomalnie dominująco, włączając chorobę Huntingtona, achondroplazję i dystrofię miotoniczną.³⁸ Określano także status nosiciela dla mukowiscydozy, hemoglobinopatii i niedoboru 21-hydroksylazy.^{38,39}

W 2008 roku w celu wykrycia trisomii chromosomów 13, 18 i 21 skutecznie zastosowano sekwencjonowanie DNA z określeniem tak zwanej dawki materiału genetycznego, odzwierciedlonej przez nadmiar lub niedobór sekwencji swoistych dla konkretnego chromosomu.⁴⁰ Wykazano, że pomiar proporcji niewielkich fragmentów DNA pochodzących z chromosomu 21 przekraczający wartość progową w stosunku do referencyjnej próbki pochodzącej z euploidalnego zarodka cechuje dodatnia wartość predykcyjna rzędu 96,6% oraz 100% ujemna wartość predykcyjna.⁴¹

Teoretycznie, stosując strategię opartą na równoległym sekwencjonowaniu dużej liczby krótkich fragmentów pozakomórkowego płodowego DNA, można by identyfikować rzadziej występujące, bardziej złożone aneuploidie wynikające z niezrównoważenia translokacji lub duplikacji części chromosomu. Ostatnio opisano wykrycie u płodu zespołu mikrodelecji na podstawie analizy sekwencji pozakomórkowego DNA płodu obecnego w surowicy matki.⁴² Na razie tego rodzaju badania pozostają w fazie eksperymentu, podobnie jak perspektywa szerszej analizy genetycznej, włączając sekwencjonowanie całego genomu (tab. 2).

Jeśli takie badania stałyby się technicznie wykonalne, nie jest jasne, czy miałyby być stosowane jako metoda badania przesiewowego, czy jako badania diagnostyczne. Jeżeli miałyby mieć istotny wpływ na podejmowanie decyzji klinicznych, ich wyniki powinny być dostępne w odpowiednio krótkim czasie, a samo badanie powinno być opłacalne z ekonomicznego punktu widzenia. W tabeli 3 zamieszczono przegląd możliwych etapów, na jakich można przeprowadzać badania diagnostyczne w kierunku muko-

wiscydozy, co ilustruje, jak ważna jest świadoma zgoda pacjentów w przypadku rozpoznawania chorób i zmienności genetycznych.

Skrining genetyczny noworodków

Każdego roku w Stanach Zjednoczonych przesiewowe badania krwi wykonywane są u około 4 milionów noworodków. Wiele osób uważa ten rodzaj skriningu za klasyczny przykład korzyści zdrowotnych, jakie populacja odnosi z zastosowania odkryć genetycznych. Jeżeli chodzi o zgodę na wykonanie badania przesiewowego noworodka, większość stanów stosuje system „opt-out” oznaczający milczącą zgodę rodziców i wymagający ich aktywnego sprzeciwu w przypadku jej braku. Obecnie w Stanach Zjednoczonych toczy się dyskusja na temat indywidualnych wyborów, ryzyka, korzyści i kosztów, a zwłaszcza włączenia do rutynowego skriningu noworodków badania dodatkowych chorób oraz rozszerzenia badań na okres przedkoncepcyjny i prenatalny.⁴³ Oparte na metodach biochemicznych badania przesiewowe noworodków w kierunku fenyloketonurii rozpoczęto w latach 60. XX wieku po tym, jak stało się jasne, że wprowadzenie diety pozbawionej fenyloalaniny może poprawić wyniki dzieci chorych na fenyloketonurię. W 2006 roku wspólne wysiłki grup poparcia oraz organizacji pediatrycznych, zdrowia publicznego i towarzystw genetycznych zaowocowały wprowadzeniem do skriningu noworodków ujednoczonego panelu obejmującego 29 chorób. Obejmują one hemoglobinopatie, endokrynopatie, mukowiscydozę, głuchotę oraz choroby metaboliczne. Wypracowano zasady, na jakich można zgłaszać do włączenia do panelu inne choroby, a następnie poddawać ocenie.^{44,45} W 2010 roku Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children zalecił dołączenie do ujednoczonego panelu skriningowego zespołu ciężkiego złożonego niedoboru odporności^{46,47} i jest w trakcie analizy dowodów popierających włączenie do niego innych chorób genetycznych, takich jak rdzeniowy zanik mięśni. W Stanach Zjednoczonych korzystanie z ujednoczonego panelu badań przesiewowych różni się w zależności od stanu, co powoduje, że diagnostyka chorób dziedzicznych u noworodków przebiega w kilku etapach.

W praktyce dostępność badań przesiewowych u noworodków, a następnie obserwacja dzieci mogą mieć znaczenie w podejmowaniu decyzji dotyczących prenatalnych badań przesiewowych u noworodków w kierunku takich chorób, jak mukowiscydoza, w przypadku której rozpoznanie krótko po urodzeniu może być przez niektórych uznane za akceptowalną alternatywę dla diagnostyki prenatalnej. U wielu par, zwłaszcza gdy znane jest ich ryzyko genetyczne, decyzja o przeprowadzeniu diagnostyki genetycznej podejmowana jest po rozmowie z lekarzem i konsultantem genetykiem. Korzyści, jakie mogą odnieść w aspekcie planów reprodukcyjnych (tj. dostęp do infor-

TABELA 3

Diagnostyka genetyczna mukowiscydozy – etapy, na których możliwe jest wykonanie badania oraz związane z nim problemy

Czas wykonania badania genetycznego	Skrining mutacji	Badanie mutacji w rodzinie	Badanie krwi na immunoreaktywny trypsynogen	Problemy etyczne	Problemy społeczne	Problemy techniczne i biologiczne
Przed poczęciem	Główne zalecenie towarzystw naukowych po uzyskaniu świadomej zgody	Diagnostyka genetyczna w przypadkach dużego ryzyka	Nie dotyczy	Istotne dla podejmowania decyzji reprodukcyjnych	Nieplanowane ciąży	Zmieniające się technologie i zmienność korelacji genotyp-fenotyp
Przed implantacją	Wybór zarodka do transferu	Diagnostyka genetyczna w przypadkach dużego ryzyka	Nie dotyczy	Moralny status zarodka	Finansowanie procedury, kwestie dostępu do badania	Potencjalne ryzyko związane z zastosowaniem metod rozrodu wspomaganego medycznie
Prenatalnie	Jeżeli nie wykonano przed poczęciem, główne zalecenie towarzystw naukowych po uzyskaniu świadomej zgody	Dostępne; może wynikać z objawów stwierdzonych prenatalnie (np. hiperechogeniczne jelito)	Nie dotyczy	Decyzja co dalszych losów ciąży, autonomia	Czas do rozpoczęcia opieki prenatalnej	Ryzyko związane z inwazyjną procedurą
U noworodka	Coraz częstsze zastosowanie w badaniach przesiewowych noworodków	Dostępne; może wynikać z objawów stwierdzonych u noworodka (np. niedrożność smółkowa)	Dostępne	Świadoma zgoda	Kiedy informować o nosicielstwie; dostęp do badań klinicznych	Zakres stopnia ciężkości z > 1000 mutacji

macji genetycznej na etapie, kiedy może ona wpłynąć na ich decyzję dotyczącą rozrodu) w przeszłości nie były brane pod uwagę jako powód dla włączenia do badań przesiewowych noworodków konkretnych chorób, natomiast obecnie staje się to coraz częściej kwestią publicznej dyskusji.⁴⁸ Dostępność badań klinicznych poświęconych potencjalnej poprawie zdrowia osób z rzadkimi chorobami także stała się argumentem na poparcie przydatności wczesnego wykrywania chorób genetycznych przez badania przesiewowe, chociaż dla niektórych z nich leczenie przynoszące korzyści może nie być znane.

Diagnostyka genetyczna noworodków

W przypadku diagnostyki pacjentów z opóźnieniem rozwoju lub niepełnosprawnością intelektualną, wadami wrodzonymi oraz cechami dysmorfii wytyczne medycy-

nych towarzystw naukowych zalecają stosowanie porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy pozwalającej na szybkie i szeroko zakrojone wykrywanie nieprawidłowości genomu. Wyjątkiem są przypadki o charakterystycznym, jednoznacznym fenotypie, które mogą być potwierdzone prostszą metodą klasycznej oceny kariotypu (np. zespół Downa).⁴⁹ Należy jednak pamiętać, że porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy jest droższa od innych metod i może wykrywać zaburzenia genetyczne o nieznanym znaczeniu klinicznym.

Postęp w genetyce pozwala potencjalnie wykrywać coraz większą liczbę chorób w stadium poprzedzającym wystąpienie objawów, co jest źródłem wielu kontrowersji o charakterze etycznym, prawnym oraz społecznym.⁵⁰ Ma to znaczenie szczególnie w sytuacji wykrycia w stadium przedobjawowym choroby genetycznej ujawniającej się w życiu dorosłym, co pociąga za sobą praktyczny dylemat,

jak najlepiej zarządzać tą informacją i w jaki sposób ujawnić ją w przyszłości. Przedobjawowe rozpoznanie stanów ujawniających się w późniejszym okresie życia, na przykład rodzinnych skłonności do nowotworów lub choroby Huntingtona, jest obecnie możliwe na etapie przedimplantacyjnym, prenatalnym lub po urodzeniu. Obecnie toczy się dyskusja na temat elektronicznych rejestrów danych dotyczących zdrowia i systemu komunikacji między nimi jako potencjalnych narzędzi do poprawy zdrowia i opieki zdrowotnej w ciągu całego życia. Przykładem mogą być kontrowersyjne wytyczne National Collegiate Athletic Association zalecające skryning wszystkich sportowców w kierunku mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie niedokrwiistości sierpowatokrwinkowej.⁵¹ Większość amerykańskich sportowców przeszła badania przesiewowe w wieku noworodkowym, jednak wyniki tych badań nie są dostępne.

Badanie genetyczne na życzenie

Usprawnienie i poprawa dokładności badań DNA oraz możliwość łatwego pozyskiwania materiału do analizy (np. złuszczone komórki obecne w ślinie) otworzyły drogę komercyjnemu wykorzystaniu badań genetycznych. Odzwierciedleniem tego jest mnogość ofert badań genetycznych obecnych w internecie, z których wiele opartych jest na szerokiej ocenie genomu i diagnostyce licznych złożonych zaburzeń genetycznych.⁵² Typowe są reklamy zachęcające do badania kilkuset różnych cech genetycznych.^{53,54} Te komercyjne oferty pojawiły się, zanim zdołano wypracować publiczną politykę i regulacje pozwalające na nadzór nad badaniami po części dlatego, że kryteria, na podstawie których oceniana jest kliniczna przydatność indywidualnej informacji genetycznej, poddawana jest ciągłej debacie.⁵⁵ Część firm podkreśla, że dostarczana jest informacja na temat genetycznych predyspozycji, przy jednoczesnej minimalizacji jej bezpośredniego wpływu na opiekę medyczną. Inne firmy zatrudniają konsultantów genetycznych lub twierdzą, że informują zainteresowane osoby o nosicielstwie choroby lub innym statusie genetycznym. Co najmniej dwie względnie nowe firmy kierują swoją ofertę do par zainteresowanych badaniem potencjalnych chorób dziedzicznych recesywnie jeszcze przed poczęciem.

Doradczy panel ekspertów działający przy Food and Drug Administration (FDA) wydał ostatnio zalecenia, aby oferty badań genetycznych kierowanych bezpośrednio do klientów były poddane nadzorowi medycznemu obejmującemu zarówno interpretację wyników, jak i wymóg zlecenia badań przez lekarzy, a nie na życzenie klienta.⁵⁶ Stanowisko ACMG i ACOG jest podobne i zgodne co do tego, aby zniechęcać do badań na życzenie, przynajmniej do czasu rozwiązania kilku istotnych kwestii, między innymi ograniczonej wiedzy na temat badań genetycznych zarówno pacjentów, jak i osób wykonujących badania, trudności w interpretacji wyników badań, braku nadzoru

federalnego oraz zagadnień prywatności i poufności.^{57,58} Konieczne będzie położenie nacisku na edukację osób świadczących tego typu usługi oraz opracowanie narzędzi pozwalających na wykonywanie badań od razu podczas wizyty, na której są zlecane, jak również większe zaangażowanie konsultantów genetyków oraz specjalistów genetyki klinicznej, włączając tych zajmujących się medycyną matczyno-łożyskową.^{59,60}

Genomika a zdrowie matki i dziecka

Zdrowie przedkoncepcyjne jest coraz szerzej uznawane za krytyczny czynnik istotny dla poprawy wyników położniczo-neonatologicznych oraz ograniczania różnic w zdrowiu poszczególnych populacji.⁶¹ Zmienność genetyczna oraz indywidualne wybory stanowią nieustające wyzwanie, jakim jest rozdysponowywanie środków w opiece zdrowotnej i przekładanie postępu w genomice na poprawę zdrowotności. Chociaż koszty sekwencjonowania ciągle się obniżają, różnice w kondycji zdrowotnej poszczególnych populacji mogą się nasilać ze względu na niejednakowy dostęp do opieki przedkoncepcyjnej i prenatalnej oraz różnice w dostępie do metod rozrodu wspomaganego medycznie, specjalistów genetyków i diagnostyki genetycznej wśród różnych populacji. Na koszty i dostęp do badań wpływ mogą mieć także kwestie dotyczące patentowania metod sekwencjonowania genów, które obecnie poddawane są analizie sądowej. Ponadto nie jest jasne, kto poniesie koszt zebrania dowodów potwierdzających, że skryning, diagnostyka oraz leczenie coraz większej liczby rzadkich chorób genetycznych przynoszą korzyści.

Wyniki badań genetycznych mogą mieć niebagatelny wpływ na decyzje dotyczące poślubienia danej osoby, posiadania dzieci czy kontynuacji ciąży. Globalizacja rynku usług leczenia niepłodności oraz różnice prawne powodują, że możliwy staje się wybór gamet, zarodków, a nawet macic, z towarzyszącymi procesowi leczenia, mniej lub bardziej szczegółowymi, badaniami genetycznymi. Aktualnym wyzwaniem technologicznym jest opracowanie metody pozyskiwania materiału z zarodka na bardzo wczesnym etapie jego rozwoju (tzw. pre-embryo) w ilości wystarczającej do pełnego zsekwenconowania materiału genetycznego oraz zintegrowana analiza pełnego genomu człowieka w kontekście znaczenia klinicznego jego poszczególnych obszarów.⁶² Postęp w genetyce i genomie oraz tempo, w jakim się on dokonuje, będą miały wpływ na diagnostykę i skryning genetyczny. Na przykład z chwilą, kiedy zwykłego konsumenta stać będzie na sekwencjonowanie pełnego genomu lub pełnego eksomu, indywidualne badanie genetyczne całego genomu metodą SNP stanie się przestarzałe. Nowsze strategie sekwencjonowania dają możliwość jednoczesnego badania wielu chorób monogenowych, jak również wykrycia mutacji o nieznanym znaczeniu klinicznym. Co więcej, jeszcze większym wyzwaniem będzie interpreta-

cja znaczenia klinicznego olbrzymiej ilości danych uzyskanych drogą sekwencjonowania pełnego genomu lub pełnego eksomu.

Podsumowanie

Wszystkie nowe technologie genomowe mogą mieć potencjalne zastosowanie w opiece przedkoncepcyjnej, prenatalnej oraz neonatologicznej, natomiast to, czy i w jaki sposób zostaną wykorzystane, wciąż pozostaje przedmiotem debaty. Mimo że obecnie jesteśmy w stanie prześwietlić ludzki genom z niebywałą precyzją, może się okazać, że genotyp nie pozwala na określenie fenotypu. W procesie opracowywania i wdrażania wytycznych należy wziąć pod uwagę kwestie zaangażowania konsumentów i orędowników badań, konfliktu interesów i analizy efektywności kosztów. Praca nad środkami umożliwiającymi monitorowanie usług genetycznych jest wciąż w powijakach. Zachęca się lekarzy, aby aktualizowali swoją wiedzę na temat najnowszych osiągnięć oraz krajowych wytycznych. Każdy lekarz pełni ważną rolę edukacyjną wobec pacjentów i jest kluczowym elementem referencyjnej sieci specjalistycznych usług łączących świat spersonalizowanej medycyny z medycyną opartą na dowodach.

Stosowne oświadczenia dostarczone przez autorów dostępne są wraz z pełnym tekstem artykułu na stronie internetowej NEJM.com.

Podziękowania dla Colleen Jackson-Cook, PhD, Virginia Commonwealth University; Micheala T. Mennuti, MD, University of Pennsylvania; Joe'a Leigh Simpsona, MD, Florida International University; Anny J.B. Smith, MPH, London School of Hygiene and Tropical Medicine oraz Thomasa J. Smitha, MD, Johns Hopkins Hospital za uwagi i komentarze pomocne w przygotowaniu manuskryptu.

From the New England Journal of Medicine 2012;366:64-73. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

PIŚMIENICTWO

- American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee opinion no. 478: family history as a risk assessment tool. *Obstet Gynecol* 2011;117:747-50.
- Genetic services policy project final report. Seattle: Washington State Department of Health, 2008 (<http://depts.washington.edu/genpol/docs/Final-Report.pdf>).
- Sharp RR, Goldlust ME, Eng C. Addressing gaps in physician education using personal genomic testing. *Genet Med* 2011; 13:750-1.
- de Jong A, Dondorp WJ, Frints SGM, de Die-Smulders CEM, de Wert GMWR. Advances in prenatal screening: the ethical dimension. *Nat Rev Genet* 2011;12: 657-63.
- American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. ACOG practice bulletin no. 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 2007;109:217-27.
- Idem. ACOG practice bulletin no. 486: update on carrier screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol* 2011;117:1028-31.
- Idem. ACOG committee opinion no. 338: screening for fragile X syndrome. *Obstet Gynecol* 2006;107:1483-5.
- Idem. ACOG practice bulletin no. 78: hemoglobinopathies in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007;109:229-37.
- Idem. ACOG committee opinion no. 442: preconception and prenatal carrier screening for genetic diseases in individuals of Eastern European Jewish descent. *Obstet Gynecol* 2009;114:950-3.
- Idem. ACOG committee opinion no. 432: spinal muscular atrophy. *Obstet Gynecol* 2009;113:1194-6.
- Driscoll DA, Gross SJ. Screening for fetal aneuploidy and neural tube defects. *Genet Med* 2009;11:818-21.
- Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. *Genet Med* 2001;3:149-54.
- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6:387-91. [Errata, *Genet Med* 2004;6:548, 2005;7:286.]
- Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Genet Med* 2005;7:584-7.
- Gross SJ, Pletcher BA, Monaghan KG. Carrier screening in individuals of Ashkenazi Jewish descent. *Genet Med* 2008;10: 54-6.
- Prior TW. Carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med* 2008;10: 840-2.
- Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 2011;3:65ra4.
- Kaback MM, Desnick RJ. Hexosaminidase A deficiency. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, eds. *GeneReviews*. Seattle: University of Washington, 1993–1999 (updated Aug. 11, 2011) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1218>).
- Anderson RA, Pickering S. The current status of preimplantation genetic screening: British Fertility Society policy and practice guidelines. *Hum Fertil (Camb)* 2008;11:71-5.
- Munné S, Howles CM, Wells D. The role of preimplantation genetic diagnosis in diagnosing embryo aneuploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21:442-9.
- Cooper AR, Jungheim ES. Preimplantation genetic testing: indications and controversies. *Clin Lab Med* 2010;30:519-31.
- Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and metaanalysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011;17:454-66.
- Treff NR, Levy B, Su J, Northrop LE, Tao X, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening is significantly more consistent than FISH. *Mol Hum Reprod* 2010;16:583-9.
- Spits C, Sermon K. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn* 2009;29:50-6.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011;26:1560-74.
- Bredenoord A, Dondorp W, Pennings G, de Die-Smulders C, Smeets B, de Wert G. Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA disorders: ethical guidance for clinical practice. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:1550-9.
- Kuliev A, Rechitsky S. Polar body based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Mol Hum Reprod* 2011 February 14 (Epub ahead of print).
- Geraedts JP, De Wert GM. Preimplantation genetic diagnosis. *Clin Genet* 2009; 76:315-25.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Revised guidelines for human embryology and andrology laboratories. *Fertil Steril* 2008; 90:Suppl:S45-S59.
- Harton G, Braude P, Lashwood A, et al. ESHRE PGD Consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod* 2011;26:14-24.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 2011; 43:838-46.
- Committee on Genetics, American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG committee opinion no. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 2009;114:1161-3.
- Go AT, van Vugt JM, Oudejans CB. Non-invasive aneuploidy detection using free fetal DNA and RNA in maternal plasma: recent progress and future possibilities. *Hum Reprod Update* 2011;17:372-82.
- Ehrich M, Decu C, Zwiefelhofer T, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204(3):205.e1-205.e11.
- Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, et al. Synergy of PLAC4 RNA concentration and measurement of the RNA single nucleotide polymorphism for the noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Clin Chem* 2010;56:73-81.
- Kido S, Sakuragi N, Bronner MP, et al. D21S418E identifies a cAMP-regulated gene located on chromosome 21q22.3 that is expressed in placental syncytiotrophoblast and choriocarcinoma cells. *Genomics* 1993;17:256-9.
- Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011;306:627-36.

38. Wright CF, Burton H. The use of cellfree fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:139-51.
39. Lazaros L, Hatzl E, Bouba I, Paraskevaides E, Georgiou I. Non-invasive prenatal detection of paternal origin Hb Lepore in a male fetus at the 7th week of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2006;21:506-9.
40. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16266-71.
41. Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011;342:c7401.
42. Peters D, Chu T, Yatsenko SA, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome. *N Engl J Med* 2011;365:1847-8.
43. Levy PA. An overview of newborn screening. *J Dev Behav Pediatr* 2010;31:622-31.
44. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR. Newborn screening: toward a uniform panel and system: executive summary. *Genet Med* 2006;8:Suppl 1:1S-252S.
45. Green NS, Rinaldo P, Brower A, et al. Committee report: advancing the current recommended panel of conditions for newborn screening. *Genet Med* 2007;9: 792-6.
46. Lipstein EA, Vorona S, Browning MF, et al. Systematic evidence review of newborn screening and treatment of severe combined immunodeficiency. *Pediatrics* 2010;125(5):e1226-e1135.
47. Recommended uniform screening panel of the Secretary's advisory committee on heritable disorders in newborns and children. Washington, DC: Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Maternal and Child Health Bureau, 2011 (<http://www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/recommended-panel/index.html>).
48. Bombard Y, Miller FA, Hayeems RZ, Avar D, Knoppers BM. Reconsidering reproductive benefit through newborn screening: a systematic review of guidelines on preconception, prenatal and newborn screening. *Eur J Hum Genet* 2010;18: 751-60.
49. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 2010;12:742-5.
50. Hudson KL. Genomics, health care, and society. *N Engl J Med* 2011;365:1033-41.
51. Anderson SA, Doperak J, Chimes GP. Recommendations for routine sickle cell trait screening for NCAA Division I athletes. *PMR* 2011;3:168-74.
52. Jostins L, Barrett JC. Genetic risk prediction in complex disease. *Hum Mol Genet* 2011;20:R182-R188.
53. Borry P, Henneman L, Lakeman P, ten Kate LP, Cornel MC, Howard HC. Preconceptional genetic carrier testing and the commercial offer directly-to-consumers. *Hum Reprod* 2011;26:972-7.
54. Vashlishan Murray AB, Carson MJ, Morris CA, Beckwith J. Illusions of scientific legitimacy: misrepresented science in the direct-to-consumer genetic-testing marketplace. *Trends Genet* 2010;26:459-61.
55. Foster MW, Mulvihill JJ, Sharp RR. Evaluating the utility of personal genomic information. *Genet Med* 2009;11:570-4.
56. Summary from the Molecular and Clinical Genetics Panel meeting — March 8–9, 2011. Washington, DC: Department of Health & Human Services. (<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/MolecularandClinicalGneticsPanel/UCM246907.pdf>).
57. American College of Medical Genetics Board of Directors. ACMG statement on direct-to-consumer genetic testing. *Genet Med* 2004;6:60.
58. Committee on Genetics, American College of Obstetricians and Gynecologists, Committee on Ethics, American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG committee opinion no. 409: direct-to-consumer marketing of genetic testing. *Obstet Gynecol* 2008;111:1493-4.
59. Family history, prenatal care, and women's health: development of a family history and genetic screening tool and educational materials for health professionals and the public. Lutherville, MD: National Coalition for Health Professional Education in Genetics, 2010 (http://www.nchpeg.org/index.php?option=com_docman&task=doc_download&grid=59&Itemid=135).
60. Feero WG, Green ED. Genomics education for health care professionals in the 21st century. *JAMA* 2011;306:989-90.
61. Broussard DL, Sappenfield WB, Fussman C, Kroelinger CD, Grigorescu V. Core state preconception health indicators: a voluntary, multi-state selection process. *Matern Child Health J* 2011;15:158-68.
62. Ashley EA, Butte AJ, Wheeler MT, et al. Clinical assessment incorporating a personal genome. *Lancet* 2010;375:1525-35.