

Strokovni prispevek/Professional article

PREDIMPLANTACIJSKA GENETSKA DIAGNOSTIKA – 4-LETNE IZKUŠNJE NA GINEKOLOŠKI KLINIKI UNIVERZITETNEGA KLINIČNEGA CENTRA LJUBLJANA

PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS – 4 YEARS' EXPERIENCE AT THE DEPARTMENT OF GYNECOLOGY, UNIVERSITY MEDICAL CENTRE LJUBLJANA

Karin Writzl, Alenka Veble, Jerneja Kmecl, Borut Peterlin, PGD skupina

Inštitut za medicinsko genetiko, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

PGD skupina: Barbara Dolničar, Paula Duff, Ksenija Geršak, Blanka Gradišek, Tatjana Ozvaldič, Barbara Požlep, Bernarda Prosenc, Milica Puklavec, Nataša Teran, Tomaž Tomaževič, Brigita Valentinčič-Gruden, Vislava Velikonja Globevnik, Irma Virant-Klun, Marija Volk, Branko Zorn, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

Izvleček

- Izhodišča** *Predimplantacijska genetska diagnostika (PGD) predstavlja možnost zgodnje preiskave zarodka pri parih, kjer obstaja velika verjetnost za genetsko nepravilnost pri potomcih. Predstavljene so indikacije ter uspešnost PGD postopkov pri parih, pri katerih je bila narejena PGD na Ginekološki kliniki v Ljubljani v obdobju od julija 2004 do decembra 2008.*
- Metode** *Retrospektivno smo analizirali 34 parov, pri katerih je bilo narejenih 60 ciklusov PGD. Pari so bili vključeni v postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo. Tretji dan je bila narejena biopsija ene ali dveh blastomer, na katerih smo naredili genetsko analizo z metodo fluorescentne in situ hibridizacije ali z metodo verižne reakcije s polimerazo. Zarodki, pri katerih je bil rezultat genetske preiskave blastomer normalen, so bili 5. dan preneseni v maternico.*
- Rezultati** *Najpogostejša indikacija so bile kromosomske nepravilnosti (67 %), sledijo ponavljajoče se neuspele nosečnosti z/brez ugotovljenimi aneuploidnimi zarodki (18 %), avtosomno recisivne in dominantne bolezni (9 %) ter na kromosom X vezane bolezni (6 %). Narejenih je bilo 60 ciklusov, prenos zarodka je bil mogoč v 48 ciklusih, pri 15 ženskah je bila klinično potrjena nosečnost, kar predstavlja 25 % delež kliničnih nosečnosti na cikel in 37,5 % delež kliničnih nosečnosti na prenos zarodka. Rojenih je bilo osem zdravih enojčkov, dve nosečnosti (od teh ena dvoplodna in obe daljši od 30 tednov) še potekata.*
- Zaključki** *PGD je tehnično izjemno zahtevna diagnostika. Uspeh je mogoč le ob sodelovanju in vrhunskem delu strokovnjakov genetike in reproduktivne medicine. Na Ginekološki kliniki v Ljubljani je bila PGD uspešno uvedena in predstavlja dodatno možnost diagnostike za pare, pri katerih obstaja velika verjetnost za genetsko mutacijo pri potomcih.*
- Ključne besede** *predimplantacijska genetska diagnostika; OBMP; FISH; PCR; nosečnost*

Abstract

- Background** *Preimplantation genetic diagnosis offers early investigation of embryos in couples with a high risk for offspring affected by a genetic disease. We report indications and results as-*

Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

Karin Writzl, Inštitut za medicinsko genetiko, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1525 Ljubljana

sociated with the PGD program conducted at Gynecology Clinic Ljubljana from June 2004 to December 2008.

Methods	<i>The retrospective analysis includes sixty cycles performed in 34 couples enrolled in the PGD programme. Embryos were biopsied on the third day and the genetic analysis was performed using the FISH and PCR methods. Embryo transfers were carried out on the fifth day.</i>
Results	<i>The main indications were chromosomal abnormalities (67 %), followed by recurrent miscarriages (16 %), autosomal dominant and recessive diseases (9 %), and X-linked diseases (6 %). Sixty cycles were performed and 48 embryo transfer procedures. There were 15 clinical pregnancies resulting in clinical pregnancy rate 25 % per cycle and 37.5 % per embryo transfer. A total of eight unaffected children were born, and two pregnancies are still ongoing.</i>
Conclusions	<i>PGD is technically a very challenging procedure. Superior knowledge and communication between geneticists and reproductive medicine scientists is mandatory for successful PGD procedures. PGD has gained a place among the choices offered at Gynecology Clinic Ljubljana to couples at risk of transmission of genetic disease.</i>
Key words	<i>preimplantation genetic diagnosis; IVF/ICSI; FISH; PCR; pregnancy</i>

Uvod

Prvi začetki predimplantacijske genetske diagnostike (PGD) segajo v leto 1990.¹ Uvedena je bila kot alternativna preiskava predrojstveni diagnostiki in namenjena parom, pri katerih obstaja velika verjetnost za rojstvo otroka z genetsko boleznijo. Populacijske študije so pokazale, da ima 1–2 % otrok monogenesko bolezen, kromosomsko mutacijo pa 0,4–0,6 % otrok.² Verjetnost za ponovitev genetske bolezni pri sorojencu je odvisna od načina dedovanja in je lahko 25-odstotna (pri avtosomno recisivnih boleznih in na kromosom X vezanih recisivnih boleznih) ali pa 50-odstotna (pri avtosomno dominantnih boleznih). Tudi strukturne kromosomske preureditve (npr. translokacije) pri starših pogosto vodijo v rojstvo otroka s prirojenimi nepravilnostmi in razvojnim zaostankom, povezane pa so lahko tudi s povečano pojavnostjo spontanov prekinitev nosečnosti ter z neplodnostjo. Do uvedbe PGD so imeli pari z ugotovljenim povečanim tveganjem za rojstvo otroka z genetsko boleznijo pet možnosti: a) sprejeti tveganje, b) odločiti se za predrojstveno diagnostiko ter prekinitev nosečnosti v primeru potrjenega genetske bolezni pri plodu, c) odločiti se za darovane spolne celice, č) odločiti se za posvojitev ali d) sprejeti odločitev, da otrok ne bodo imeli. Z uvedbo PGD so dobili novo možnost.

V sredini 90. let je bila uvedena še metoda predimplantacijskega genetskega presejanja (PGS – preimplantation genetic screening) za ugotavljanje kromosomskih aneuploidij na blastomerah.³ Z naraščanjem materine starosti narašča verjetnost aneuploidnih zarodkov, ki v večini primerov vodijo v spontani splav. Največjo korist genetskega presejanja zarodkov bi torej pričakovali v skupini starejših žensk ter žensk s ponavljajočimi spontanimi splavi ali neuspelo implantacijo zarodka. Dosedanji rezultati randomizirnih kontrolnih študij učinkovitosti genetskega presejanja zarodkov niso potrdili.⁴

PGD predstavlja najzgodnejšo obliko predrojstvene diagnostike, saj ta poteče pred vnosom zarodka v

maternico. S tem se starši lahko izognejo prekinitvi nosečnosti ter s tem povezani psihični in fizični travmi. Postopek PGD zajema štiri faze: a) postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo, b) izolacijo ene ali dveh blastomer zarodka, c) genetsko preiskavo blastomer z metodo fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) ali metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) ter č) prenos zarodka z normalnim rezultatom genetske preiskave v maternico.

Namen članka je predstaviti indikacije ter uspešnost PGD postopkov pri parih, pri katerih je bila narejena PGD na Ginekološki kliniki v Ljubljani v obdobju od julija 2004 do decembra 2008.

Metode dela

V retrospektivno študijo so bili zajeti pari, pri katerih je bil v obdobju od julija 2004 do decembra 2008 opravljen postopek PGD na Ginekološki kliniki v Ljubljani.

Pari so najprej imeli posvet pri kliničnem genetiku, kjer so bili seznanjeni s postopkom PGD. Sledila je laboratorijska priprava na diagnostiko. Pri starših, v primeru monogeneskih boleznih pa tudi pri bolnih in zdravih otrocih, smo odvzeli krvni vzorec ter preverili možnost izvedbe preiskave z metodo FISH ali PCR. Pripravo na preiskavo ter preiskavo z metodo FISH smo izvedli v molekularno-citogenetskem laboratoriju Inštituta za medicinsko genetiko Ljubljana, preiskavo z metodo PCR pa v sodelovanju z laboratorijem Genoma v Rimu, Italija. V okviru priprave na postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo je imel par usmerjeni pregled pri ginekologu, andrologu ter pogovor pri psihologu. Pred vstopom v postopek je par podpisal informirano privoljenje, kjer smo ju med drugim seznanili z možnostjo napake pri diagnostiki ter možnostjo, da do prenosa zarodka sploh ne pride. Vsak postopek je odobril konzilij za oploditev z biomedicinsko pomočjo (OMBP) in PGD konzilij.

Pri parih, kjer je genetska preiskava potekala z metodo PCR, so bile jajčne celice oplojene z neposrednim vnosom semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI), pri parih, kjer je bila preiskava narejena z metodo FISH, pa pri večini z metodo klasične zunajtelesne oploditve (IVF). Izjemo so predstavljali pari, pri katerih je bil ugotovljen slab spermogram ali pa so predhodno že imeli neuspele postopke z metodo klasične zunajtelesne oploditve.

Preiskava PCR je bila izvedena samo v primeru, če je bila narejena izolacija blastomer na dveh ali več zarodkih, medtem ko je bila diagnostika FISH izvedena tudi v primeru, ko je bila narejena izolacija blastomere le enega zarodka pri paru. Izolacija blastomere iz zarodka je bila narejena tretji dan postopka v laboratoriju za oploditev z biomedicinsko pomočjo. Izolirana je bila ena ali dve blastomeri. Genetska diagnostika je bila izvedena v dveh dneh. Peti dan sta bila eden ali dva zarodka prenesena v maternico, preostali zarodki, ki so se morfološko lepo razvili in imeli normalen rezultat genetske preiskave, so bili zamrznjeni. Vsem parom je bila ponujena prenatalna diagnostika za potrditev rezultatov PGD.

Rezultati

V postopek PGD je bilo vključenih 34 parov. Najpogostejša indikacija so bile kromosomske preureditve (67 %) (Tab. 1).

Opravljenih je bilo 60 postopkov. Število postopkov je iz leta v leto naraščalo. Leta 2004 sta bila narejena 2

postopka, leta 2008 pa 24. Povprečna starost ženske je bila 32.6 ± 2.9 let. Pari so imeli od enega do štiri postopke. Pridobljenih je bilo 606 oocitov (10.06 ± 4.9 oocitov na cikel).

Analizirali smo blastomere 281 zarodkov: 261 (93 %) z metodo FISH in 20 (7 %) z metodo PCR. Pri indikaciji strukturnih kromosomskih preureditev je bil normalen izvid genetske preiskave ugotovljen le pri 24,5 % (38/155) analiziranih blastomer, neuravnovešena kromosomska struktura je bila ugotovljena pri 65,8 % (102/155), pri 9,6 % (15/155) pa so bile ugotovljene druge kromosomske nepravilnosti ali pa interpretacija rezultatov analize ni bila mogoča.

Biokemična nosečnost je bila potrjena pri 17 ženskah, klinična pri 15. Pri petih je prišlo do prekinitve nosečnosti. Dve prekinitvi sta bili v drugem trimesečju nosečnosti po opravljeni amniocentezi. Osem jih je rodilo zdrave otroke, enojčke. Dve nosečnosti še potekata; ena je dvoplodna (Tab. 2).

Pri vseh parih, ki so se ob PGD odločili še za prenatalno diagnostiko, je bil izvid preiskave normalen.

Razpravljanje

PGD na Ginekološki kliniki v Ljubljani predstavlja uspešno alternativno diagnostiko prenatalni diagnostiki pri parih, kjer obstaja velika verjetnost genetske mutacije pri potomcih. Naraščanje števila letnih preiskav kaže na interes parov za tovrstno diagnostiko.

Porazdelitev indikacij v naši skupini pomembno odstopa od objavljenih podatkov PGD konzorcija

Tab. 1. Indikacije za PGD pri parih v obdobju 2004–2008.

Table 1. Indications for which PGD has been carried out at our unit from 2004–2008.

Autosomal dominantne bolezni / Autosomal dominant diseases		2 (6 %)
	Miotonična distrofija / Myotonic dystrophy	2
Autosomalno recisivne bolezni / Autosomal recessive diseases		1 (3 %)
	Adrenogenitalni sindrom / Congenital adrenal hyperplasia	1
Na kromosom X vezane bolezni / X-linked diseases		2 (6 %)
	Alport sindrom / Alport syndrome	1
	Hemofilija A / Haemophilia A	1
Kromosomske nepravilnosti / Chromosomal abnormalities		23 (67 %)
Recipročne translokacije / Reciprocal translocations	46,XY,t(7;13)(q31.2;q33) 46,XX,t(3;9)(p25;q22) 46,XY,t(1;10)(p36.1;q26.3) 46,XX,t(10;11)(p13;q13.5) 46,XX,t(3;15)(q26.2;p11.2) 46,XY,t(7;11)(q32;q23) 46,XX,t(10;14)(q23;q31) 46,XX,t(3;5)(q13.3;p15.3) 46,XX,t(13;21)(q12.2;q22.2) 46,XX,t(11;22)(q25;q13) 46,XX,t(1;8)(p36.2;p23.2) 46,XX,t(2;5)(p13;p15.1) 46,XX,t(2;13)(p12;q33) mos 47,XXY/46,XY,t(12;22)(q12;q13.3)	14
Robertsonove translokacije / Robertsonian translocations	45,XY,der(13;14)(q10;q10) 45,XX,der(13;14)(q10;q10)	2
Aneuploidije spolnih kromosomov / Sex chromosome aneuploidy		7
PGS		6 (18 %)
	Ponavljajoče se spontane prekinitve nosečnosti z ugotovljenimi številčnimi kromosomskimi nepravilnostmi / Recurrent miscarriages with numerical chromosome abnormalities	4
	Ponavljajoči neuspehi postopki OBMP / Repeated IVF failure	2
Skupaj / Total		34 (100 %)

OBMP = oploditev z biomedicinsko pomočjo / IVF = in vitro fertilisation

Tab. 2. *Analiza parov, pri katerih je bila narejena PGD; število ciklusov, prenosov zarodkov, nosečnosti, splavov ter rojenih otrok.*Table 2. *Analysis of PGD cycles, number of cycles, transferred embryos, pregnancies, miscarriages and born children.*

Diagnostična preiskava	Štev. parov	Štev. ciklusov z oociti	Štev. prenosov zarodka	Delež kliničnih nosečnosti na ciklus (%)	Delež kliničnih nosečnosti na prenos zarodka (%)	Delež rojstev na ciklus (%)	Delež rojstev na prenos zarodka (%)	Splavi	Otroci
Diagnostic investigation	No. of couples	Cycles to OR	No. of ET	Ongoing pregnancy rate per cycle (%)	Ongoing pregnancy rate per ET (%)	Delivery rate per cycle (%)	Delivery rate per ET (%)	Miscarriages	Children
FISH									
Kromosomske translokacije Chromosomal Translocations	16	27	20	33,3	45,0	(18,5)**	(25)**	4	3(3)*
Aneuploidije spolnih kromosomov Sex chromosome aneuploidy	7	11	10	18,1	20,0	9,0	10,0	1	1
Na kromosom X vezane bolezni X-linked diseases	2	8	8	37,5	37,5	37,5	37,5	–	3
PGS	6	7	6	14,2	16,7	14,2	16,7	–	1
Skupaj (FISH) Total (FISH)	31	53	44	28,3	34,0	(18,8)**	(22,7)**	5	8(3)*
PCR									
Autosomno dominantne in recesivne bolezni Autosomal dominant and recessive diseases	3	7	4	–	–	–	–	–	–
Skupaj (FISH in PCR) Total (FISH and PCR)	36	60	48	25,0	31,2	(16,6)**	(20,8)**	5	8(3)*

* Dve nosečnosti (ena dvoplodna) še potekata (trajanje 33/37 tednov)

Two ongoing pregnancies (33/37 weeks)

** Podatki so v oklepaju, ker je pri izračunu upoštevan ugoden izid nosečnosti, ki še potekata

Rates considering a successful outcome of the two ongoing pregnancies

OR = oocyte retrieval

ET = embryo transfer

ESHRE.⁵ Pri slednjih je bil delež PGD postopkov za monogenske bolezni (15,6 %) primerljiv z deležem PGD postopkov za kromosomske nepravilnosti (13,8 %). V naši skupini je bilo največ PGD postopkov narejenih v skupini z indikacijo kromosomske nepravilnosti (63 %, 38/60), medtem ko je bil delež postopkov PGD za monogenske bolezni z metodo PCR majhen (11,6 %, 7/60). Vzrok, da so se pari s kromosomsko indikacijo pogosteje odločali za postopke PGD, je lahko dejstvo, da je pri številnih prisotna zmanjšana plodnost in s tem posledično potreba po postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo. Pogoste so tudi predhodne spontane ali medicinske prekinitve nosečnosti. Dodaten razlog je lahko boljša dostopnost preiskave FISH. Slednje je botrovalo tudi odločitvi za selekcijo spola z metodo FISH pri parih z na kromosom X vezanim obolenjem. Za to metodo sta se odločila oba para kljub dejstvu, da je pri selekciji spola pričakovani delež primernih zarodkov za prenos manjši (50 %) kot pri preiskavi PCR (75 %).

Število postopkov PGS je v tujini v zadnjih letih zelo hitro naraščalo; v letih 1997–1998 je bilo v poročilu ESHRE objavljeno 116 postopkov, za leto 2006 pa 3900 (66,5 %).⁵ Glede na rezultate randomiziranih kontrolnih študij, ki niso potrdili učinkovitosti genetskega presejanja zarodkov, pri nekaterih pa je bil ugotovljen celo škodljiv učinek preiskave, je pričakovati, da bo število postopkov PGS upadlo.⁶ Po mnenju ACOG (The American College of Obstetricians and Gynecologists) naj bi

v skupini parov s ponavljajočimi se spontanimi splavi z nepojasnjanim vzrokom ali neuspelo implantacijo zarodka postopke PGS izvajali samo še v okviru študij z informiranim privoljenjem.⁷ V naši skupini so postopki PGS predstavljali 11,7 % delež vseh postopkov. Nikoli ni bila indikacija le starost matere; najpogostejša indikacija so bile ponavljajoče se spontane prekinitve nosečnosti z ugotovljenimi aneuploidnimi zarodki. Delež nosečnosti po postopkih PGD v skupini naših parov je primerljiv s podatki PGD konzorcija ESHRE.⁵ V naši skupini je bil pri 60 ciklusih in 48 prenosih zarodka delež kliničnih nosečnosti na ciklus 25 % ter delež kliničnih nosečnosti na prenos zarodka 37,5 %. Po podatkih PGD konzorcija ESHRE je bilo v obdobju 1997–2005 pri 15885 ciklusih in 11486 prenosih zarodkov delež kliničnih nosečnosti na ciklus 18 % ter delež kliničnih nosečnosti na prenos zarodka 25 %, v letu 2006 pa pri 5858 ciklusih in 4216 prenosih zarodkov delež kliničnih nosečnosti na ciklus 21 % ter delež kliničnih nosečnosti na prenos zarodka 29 %.⁵

Delež prekinitve nosečnosti je bil v naši skupini relativno visok (33,3 %, 5/15) (v poročilu ESHRE 14 %).⁵ Dve od petih prekinitve nosečnosti sta bili v drugem trimesečju po opravljeni amniocentezi. Izvida kromosomske analize sta bila normalna.

Parom po PGD se ponudi možnost prenatalne diagnostike. V literaturi so opisani primeri napak pri PGD.⁸ Točna ocena verjetnosti napake ni znana, saj se napaka v večini primerov prepozna le po rojstvu otroka z ge-

netško mutacijo, ne pa v primerih, ko do nosečnosti ne pride oziroma se nosečnost zaključi z zgodnjim splavom. Najverjetneje tudi vsi laboratoriji ne javljajo napak. Po podatkih PGD konzorcija je bil delež javljenih napak 0,1 % pri metodi FISH in 0,5 % pri metodi PCR.⁸ Vzroki so različni: zamenjava zarodka zaradi nepravilne oznake izoliranih celic, prenos napačnega zarodka, kontaminacija izolirne celice z materino ali očetovo DNA, izguba alela, nepravilna uporaba sond ali oligonukleotidnih začetnikov, slaba hibridizacija ali pomnoževanje in kromosomski mozaicizem. Slednji pravzaprav ne predstavlja napake, pač pa je nepravilno sklepanje o »normalnem/nenormalnem« zarodku po analizi ene ali dveh blastomer posledica omejitve metode FISH. Mozaicizem je namreč pogosto prisoten v zgodnjih fazah embrionalnega razvoja.⁹ V predimplantacijskem obdobju predstavlja najpogostejšo obliko diploidni-aneuploidni mozaicizem.^{10, 11} Normalen genetski izvid izolirane blastomere zato ne pomeni nujno tudi normalnega genetskega izvida preostalih blastomer zarodka in obratno. Nepravilno sklepanje na genetski status zarodka po pregledu ene blastomere se verjetno najpogosteje pojavlja predvsem v postopkih PGS in je eden od možnih vzrokov za ugotovljeno neučinkovitost postopka PGS. Pri nobenem od naših primerov nismo ugotovili napake pri diagnostiki.

PGD sproža tudi številna etična vprašanja. Najpogostejše so vezana na indikacije za postopek. O utemeljenosti indikacije je v vseh primerih odločal konzilij PGD. Zavrnil je vlogo para, ki je želel selekcijo spola brez potrjenega medicinskega razloga. Zavrnjena je bila tudi vloga para, v katerem je imel eden od staršev 50-odstotno verjetnost, da v odraslem obdobju zbolijo za genetsko boleznijo, ni pa želel vedeti svojega genetskega statusa. Pri odločitvi za prenatalno diagnostiko bi v primeru, da bi bil genetski izvid otroka normalen, ostal genetski status enega od staršev nerazkrit, v primeru ugotovljene mutacije pa bi s tem bila posredno razkrita tudi mutacija pri enem od staršev. Temu bi se s postopkom PGD lahko izognili. V podobnih primerih se številni laboratoriji odločajo za PGD.¹²⁻¹⁴

Zaključki

PGD je tehnično izjemno zahtevna diagnostika. Uspeh je mogoč le ob sodelovanju in vrhunskem delu strokovnjakov genetike in reproduktivne medicine. Na

Ginekološki kliniki v Ljubljani je bila PGD uspešno uvedena in predstavlja dodatno možnost diagnostike za pare, pri katerih obstaja velika verjetnost za genetsko mutacijo pri potomcih.

Literatura

1. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768–70.
2. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 677–93.
3. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidman M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1995; 10: 1923–7.
4. Mastenbroek S, Scriven P, Twisk M, Viville S, Van der Veen F, Repping S. What next for preimplantation genetic screening? More randomized controlled trials needed? *Hum Reprod* 2008; 23: 2626–8.
5. Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod*. V tisku 2009.
6. Fritz MA. Perspectives on the efficacy and indications for preimplantation genetic screening: where are we now? *Hum Reprod* 2008; 23: 2617–21.
7. Preimplantation genetic screening for aneuploidy (ACOG Committee Opinion No. 430). *Obstet Gynecol* 2009; 113: 766–7.
8. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 2009; 24: 1221–8.
9. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995; 15: 41–9.
10. Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* 2002; 17: 413–9.
11. Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21: 223–33.
12. Sermon K, De Rijcke M, Lissens W, De Vos A, Platteau P, Bonduelle M, et al. Preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease with exclusion testing. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 591–8.
13. Braude PR, De Wert GM, Evers-Kiebooms G, Pettigrew RA, Geraedts JP. Non-disclosure preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease: practical and ethical dilemmas. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1422–6.
14. Jasper MJ, Hu DG, Liebelt J, Sherrin D, Watson R, Tremellen KP, et al. Singleton births after routine preimplantation genetic diagnosis using exclusion testing (D4S43 and D4S126) for Huntington's disease. *Fertil Steril* 2006; 85: 597–602.