

**Diagnosi Genetica Preimpianto di Fibrosi Cistica.
Note tecniche. Valutazioni e orientamento.**

**Documento elaborato dalla Commissione Diagnosi Genetica
Preimpianto (PGD) del Gruppo Italiano Fibrosi Cistica (GIFC)**

**Approvato dal Gruppo Italiano Fibrosi Cistica (GIFC)
della Società Italiana di Pediatria (SIP)
Commissione Diagnosi Genetica Preimpianto**

Questa Commissione si è costituita all'interno del Gruppo Italiano Fibrosi Cistica nel marzo 2001 ed ha operato fino al marzo 2003.

La sua composizione è stata polidisciplinare, essendo formata da operatori attivi nel campo della fibrosi cistica in vari Centri italiani e con competenze diversificate nell'area della pediatria, della genetica medica, della biologia molecolare e della psicologia clinica.

Obiettivo della Commissione sono l'acquisizione e la diffusione di conoscenze sul tema della Diagnosi Genetica Preimpianto in generale e di Fibrosi Cistica in particolare.

La Commissione ha organizzato, con il supporto finanziario della Fondazione Ricerca per la Fibrosi Cistica di Verona, un Convegno di Studio (Diagnosi Genetica Preimpianto di Fibrosi Cistica, Ospedaletto di Pescantina, Verona-18,19 Gennaio 2002) a cui hanno partecipato i massimi esperti europei in questo campo, che già realizzano la Diagnosi Genetica Preimpianto nelle strutture sanitarie pubbliche dei paesi in cui operano.

Al Convegno ha fatto seguito la stesura di questo documento, che è stato approvato dal Direttivo del Gruppo Italiano Fibrosi Cistica nel marzo 2003.

Il documento è stato presentato come contributo di esperti alla Società Italiana di Genetica Umana, alle Società Scientifiche che si occupano di infertilità e alla Commissione Sanità che nel settembre 2003 deve pronunciarsi definitivamente al Senato sul testo della legge riguardante la Procreazione Medicalmente Assistita (XIV Legislatura, Disegno di Legge n.1514, approvato dalla Camera il 18 giugno 2002).

Graziella Borgo
Antonio Amoroso
Serena Di Marco
Luciana Iapichino
Annamaria Giunta
Faustina Lalatta
Marco Lucci
Manuela Seia
Francesca Torricelli

Centro Fibrosi Cistica, Verona
IRCCS Burlo Garofolo, Trieste
Centro Fibrosi Cistica, Palermo
Centro Fibrosi Cistica, Palermo
Ist. Pediatria e Neonatologia, Università Milano
Genetica Medica, ICP, Milano
A.O. S. Anna, Ferrara
Laboratorio Genetica Medica, ICP, Milano
U.O. Citogenetica-Genetica, A.O. Careggi, Firenze

"Diagnosi Genetica Preimpianto di Fibrosi Cistica. Note tecniche.Valutazioni e orientamento."

Note tecniche

La PGD è quella procedura medica che permette di diagnosticare una malattia genetica in un embrione nelle fasi iniziali dello sviluppo, prima dell' impianto in utero (1,2,3,4,5,6,7,8).

Le condizioni in cui viene applicata sono varie: comprendono sia le alterazioni di numero e morfologia dei cromosomi (quindi aneuploidie, traslocazioni e altro) sia le malattie ereditarie dovute a difetti di singoli geni.

Un ciclo per PGD consiste nelle seguenti fasi :

- consultazioni preliminari
- valutazione di fattibilità
- induzione dell' ovulazione e prelievo degli ovociti nella donna
- fertilizzazione in vitro degli ovociti con gli spermatozoi
- coltura e biopsia degli embrioni
- diagnosi genetica o cromosomica delle cellule embrionarie prelevate
- trasferimento in utero degli embrioni non affetti
- follow-up della gravidanza (comprendente villocentesi per conferma del risultato della PGD)

Consultazioni preliminari

Prima di procedere alla fase operativa la coppia deve avere l' opportunità di accedere ad una serie di colloqui con : genetista, ginecologo, psicologo se necessario.

Questi colloqui hanno lo scopo di fornire alla coppia le informazioni sulla procedura, i suoi risultati e rischi, e agli operatori gli elementi per la valutazione di fattibilità tecnica.

Fase operativa

Dal momento in cui la coppia ritiene accettabile la PGD e l' equipe (genetista-ginecologo-biologo) ne formula una valutazione di fattibilità tecnica, il ginecologo dà inizio agli interventi mirati ad ottenere nella donna una superovulazione. Mediante la somministrazione di combinazioni di farmaci (analogo dell' ormone GnRH e gonadotropine ipofisarie) si induce il reclutamento e la maturazione di numerosi follicoli ovarici.

La risposta ovarica, soggettiva, viene giornalmente controllata con monitoraggio ecografico e/o ormonale .Si ottiene in questo modo nella donna la produzione di un numero variabile di ovociti: essi vengono aspirati per via transvaginale, in analgesia.

Per avviare il ciclo di PGD è necessario poter raccogliere almeno 6-10 ovociti.

Fertilizzazione dell' ovocita

Viene normalmente utilizzata la tecnica detta ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection =iniezione diretta di un solo spermatozoo nel citoplasma dell' ovulo), sia per aumentare l' efficacia della procedura fecondativa che per evitare il possibile inquinamento associato alla permanenza di altri spermatozoi adesi alla zona pellucida dell' ovulo (9,10,11).Tale evenienza può essere fonte di errore diagnostico nel caso di diagnosi genetica su singola cellula.

A partire dal momento in cui avviene la fusione del patrimonio genetico dell' ovocita e dello spermatozoo, l' ovocita è fertilizzato (=zigote) e prende avvio il processo di crescita cellulare che porta alla formazione dell' embrione. Il prelievo delle cellule embrinarie (blastomeri) su cui eseguire l' indagine genetica può potenzialmente avvenire in vari stadi dello sviluppo dell' embrione. La maggior parte dei Centri PGD considera ottimale lo stadio embrionale,raggiunto 3 giorni dopo l' ICSI, corrispondente allo sviluppo di 6-8 cellule (12,13).

E' stata sperimentata una tecnica di indagine genetica dell' ovocita prima di essere fertilizzato (analisi del globulo polare), ma per realizzare la diagnosi è comunque sempre necessaria una seconda analisi eseguita dopo la fertilizzazione (14,15).

Micromanipolazione dei blastomeri (microbiopsia)

Questa procedura consiste nel prelevare almeno due blastomeri (sui 6-8 formati) da destinare all' analisi in laboratorio.Un prelievo più tardivo quando l' embrione è allo stadio di blastocisti (circa 100 cellule,5 giorni dopo la fertilizzazione) avrebbe il vantaggio di fornire maggiori quantità di DNA su cui lavorare.Tuttavia le tecniche di coltura in vitro dell' embrione fino a quell' epoca non sono ancora sufficientemente collaudate (16).

Diagnosi Preimpianto -Analisi molecolare e/o citogenetica su singola cellula

Sulle due cellule prelevate viene eseguita nell' arco di 48 ore la diagnosi genetica.In pratica alla fine della terza giornata di sviluppo l' embrione o gli embrioni diagnosticati non affetti possono essere trasferiti in utero.

Alla base della diagnosi genetica vi è la tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction) che permette di ottenere una quantità di DNA idonea all' analisi genetica a partire dalla minima quantità contenuta in una singola cellula (17).Le tecniche di PCR possono essere associate a varie tecniche di analisi molecolare (RFLP, DGGE,SSCP, analisi eteroduplex e sequenziamento DNA, analisi diretta di mutazioni).Nel caso di analisi cromosomiche si utilizza la procedura FISH o CHG.

Le possibilità di errore diagnostico sono dovute principalmente a tre fattori :

-contaminazione del DNA "singola cellula" con DNA estraneo

-fallimento della PCR

-ADO (Allele Drop Out= perdita di un allele) per cui il DNA di uno solo dei due alleli e quindi di una sola delle due copie del gene in esame viene amplificata e riconosciuto , con la conseguenza di diagnosticare come omozigote sano o malato un embrione che è eterozigote sano (18).

Procedura postmolecolare -Impianto dell' embrione

Gli embrioni che risultano non affetti e che morfologicamente si presentano più idonei all' impianto vengono trasferiti in utero.La manovra del trasferimento si realizza con un semplice catetere e la procedura non necessita di anestesia.

Gli embrioni diagnosticati sani ma non trasferiti in utero vengono sottoposti a crioconservazione : è quindi possibile tentare di trasferirli in un secondo momento se il primo ciclo dovesse fallire .L' impianto dell' embrione in utero dipende da una serie di fattori (l' età avanzata della donna è un fattore negativo per l' impianto).

In base all' esperienza dei Centri già operativi si tende a trasferire due o tre embrioni , meno frequentemente un numero maggiore di tre (solo per lo più in donne oltre i 40-42 anni).Sul totale delle gravidanze che si ottengono quelle plurime sono circa il 30% .

Dopo 14 giorni dal trasferimento degli embrioni in utero si procede ad un controllo della beta HCG per verificare la riuscita dell' impianto. Dopo altre due settimane vi è il controllo ecografico. Se la gravidanza si è avviata è buona norma procedere ,in accordo con la coppia, ad un controllo tradizionale del risultato diagnostico tramite villocentesi e analisi del DNA fetale alla 10a settimana o amniocentesi alla 16a settimana .

Valutazioni e orientamento

1. Definizione di PGD

- 1.1 Procedura diagnostica complessa e sofisticata, realizzabile attraverso competenze polidisciplinari di alta specializzazione presenti in un numero limitato di centri. Va considerata ancora in fase sperimentale (vedi sotto punto 2).
- 1.2 Può essere utile nei programmi di fecondazione medicalmente assistita, per la scelta degli embrioni da trasferire in utero. Permette infatti la selezione degli embrioni affetti da malattie genetiche gravi .
- 1.3 Non è e non deve essere destinata a diventare una metodologia alternativa alla diagnosi prenatale
- 1.4 E' quindi applicabile in un ambito molto ristretto di indicazioni (vedi 3.3)

2. Giustificazione della PGD quale metodo sperimentale

- 2.1 Esperienza limitata. Nonostante questo metodo sia conosciuto dalla comunità scientifica da più di 10 anni e siano stati eseguiti circa un migliaio di cicli per PGD, in una cinquantina di Centri nel mondo, solo circa 650 sono oggi i nati da PGD (19). Di questi circa 50 sono nati da coppie ad alto rischio di FC.
- 2.2 Sicurezza relativa: non è conosciuto con certezza se la biopsia del blastomero possa risultare dannosa per lo sviluppo dell'organismo, anche se finora non è stato evidenziato alcun effetto negativo. Non parrebbe al momento che vi sia rischi aggiuntivi di malformazioni o danni fetali che non siano intrinseci alle procedure della Fecondazione in Vitro (IVF). Questi ultimi sono comunque accertati (vedi 4.1.7). Per eventuali effetti a distanza il follow-up dei soggetti nati oggi da PGD è da considerarsi ancora troppo breve (è al massimo di dieci anni).
- 2.3 Accuratezza: la sensibilità della diagnosi non è non ottimale. I rischi di errore (dovuti principalmente alla eventuale contaminazione del DNA, all' "allele drop out" - ADO, all'elevato mosaicismo delle cellule del blastomero) sono ancora rilevanti (circa 5%). Essendo procedura diagnostica non conclusiva nei centri in cui viene praticata viene sempre fornita l' indicazione all' esecuzione di diagnosi prenatali (villocentesi o amniocentesi).
- 2.4 Efficienza: il tasso di successo per ogni ciclo di PGD è ancora relativamente basso: 25% circa. Questo perchè ad ogni fase della procedura ci sono probabilità di successo ma non certezze (90% per la fecondazione in vitro, 70% per biopsia e diagnosi, 30% per l' impianto dell' embrione).
- 2.5 Mancanza di regolamentazione :non esistono in Italia una legislazione che regolamenti la procedura, né linee guida in campo scientifico a cui riferirsi. Vedi avanti 9.7 per la situazione in altri paesi d' Europa.

3. Diritto all'informazione sulla PGD

- 3.1 Rendendo noti i limiti di una procedura non consolidata, appare giustificato che in sede di consulenza per le coppie nelle quali vi sia un'indicazione alla diagnosi prenatale, la PGD venga

inclusa tra le opzioni di intervento (anche per le coppie che non lo richiedano in maniera esplicita)

3.2 La presentazione della procedura può essere sintetica, e per un'eventuale trattazione in dettaglio può essere consigliato un successivo incontro

3.3 I consultandi dovrebbero realizzare che la PGD trova di massima le seguenti indicazioni:

3.3.1 Coppie con problemi di infertilità, che per avviare una gravidanza necessitino di una fecondazione assistita, nelle quali vi sia rischio di malattie genetiche gravi per le quali sarebbe comunque indicata una diagnosi prenatale

3.3.2 Coppie con una storia riproduttiva gravata da una o più interruzioni di gravidanza per malattie genetiche fetali

3.3.3 Coppie a rischio di malattie genetiche gravi (per le quali sarebbe comunque indicata una diagnosi prenatale), contrarie all'interruzione di gravidanza

4. Le informazioni da fornire

4.1 Alcune connesse con la Fecondazione In Vitro (IVF)

4.1.1 Può consentire la procreazione in coppie altrimenti infertili

4.1.2 Procedura complessa, lunga, invasiva, non esente per la donna da rischi connessi all' induzione della superovulazione e alla procedura invasiva del recupero degli ovociti

4.1.3 Tasso di successo limitato, 20-25% di gravidanze per ciclo

4.1.4 Rischio di gravidanze gemellari (1/3)

4.1.5 Rischio di parto prematuro

4.1.6 Peso alla nascita mediamente più basso rispetto ai nati da gravidanze naturali, anche e soprattutto per gravidanze singole

4.1.7 Rischio di malformazioni maggiori evidenziabili fino al 1 anno d' età pari a 8%, circa doppio rispetto alle gravidanze naturali

4.1.8 Comporta inevitabilmente la produzione di embrioni sovranumerari che non vengono trasferiti in utero e dei quali va decisa la destinazione (20)

4.2 Alcune proprie della PGD

4.2.1 riduce il ricorso all'interruzione di gravidanza per la prevenzione delle malattie genetiche gravi

4.2.2 è teoricamente possibile per tutte le malattie per le quali è disponibile un test genetico prenatale, ma la fattibilità è valutata caso per caso dal centro che la esegue

4.2.3 non sembra gravata da rischi malformativi ulteriori rispetto a quelli indotti dalla IVF(4.1.7)

4.2.4 è una procedura ancora non consolidata, tecnicamente complessa, che prevede la biopsia di due blastomeri e l'indagine genetica su ognuno di essi

4.2.5 ha un tasso di errore pari al 5%

4.2.6 è comunque indicata la diagnosi prenatale (villocentesi o amniocentesi) per la conferma diagnostica

4.2.7 ha un costo elevato (complessivamente circa 5000-15000 • per ciclo). Tale costo è, nella maggior parte dei centri, a carico di chi la richiede

4.2.8 è disponibile in pochissimi centri, la quasi totalità dei quali sono esteri, che di solito richiedono la presa in carico anche della procedura di fecondazione assistita

4.2.9 comporta la manipolazione di embrioni, l' eliminazioni di quelli malati, la conservazione di quelli sani o portatori sani di tratti genetici monofattoriali

5 Lo sviluppo in Italia di centri per la PGD

5.1 Pur trattandosi di una procedura sperimentale, è sentita l'esigenza che anche in Italia si sviluppino un'esperienza specifica nel campo della PGD

- 5.2 La problematica della PGD non è limitata alla FC, ma coinvolge numerose patologie genetiche
- 5.3 Devono al momento attrezzarsi pochissimi centri (meno di 5), che si rendano disponibili a soddisfare le richieste di PGD riguardanti sia FC e altre malattie monofattoriali che malattie da anomalie cromosomiche

6 Caratteristiche del centro di PGD

- 6.1 Collocato in una struttura pubblica del servizio sanitario nazionale
- 6.2 Che abbia a disposizione uno staff medico specialista di genetica medica in grado di farsi carico dell' intero percorso diagnostico
- 6.3 Che sia parte di servizi di genetica medica con esperienza sia di citogenetica che di genetica molecolare
- 6.4 Che sia affiancato da un centro di fecondazione medicalmente assistita , con personale esperto in tecniche IVF e micromanipolazione degli embrioni
- 6.5 Con un numero adeguato di personale di laboratorio (per garantire costantemente la fattibilità di PGD),esperto nelle tecniche diagnostiche (diagnosi genetica molecolare su di una cellula) . Non tutto il personale deve essere dedicato esclusivamente alla PGD.
- 6.6 Con la possibilità di strutturare laboratori ed attrezzature ad hoc (almeno 2 locali per le procedure pre e post PCR)
- 6.7 Che sia collegato a organizzazioni internazionali di valutazione e follow-up dei risultati (registri PGD)
- 6.8 E' possibile una organizzazione PGD basata su una collaborazione fra gruppi indipendenti anche situati in istituzioni diverse : esistono per esempio all' estero più centri di medicina riproduttiva che collaborano con un singolo laboratorio in cui vien realizzata la specifica analisi genetica.
- 6.9 Al momento in Italia nell' ambito delle strutture pubbliche unadue centri hanno un programma di studio e avvio di PGD . Vi sono alcuni centri a carattere privato cui è possibile chiedere PGD per un ristretto numero di patologie genetiche o cromosomiche.

7. Stima delle possibili richieste.

- 7.1 Le principali ragioni della richiesta delle PGD finora eseguite sono (dati Consorzio ESRHE = European Society of Human Reproduction and Embriology) :
 - 36% alto rischio genetico e obiezione all' interruzione di gravidanza
 - 25% rischio genetico e infertilità
 - 21 % rischio genetico e precedenti aborti ripetuti per patologia genetica
- 7.2 Si può ipotizzare che circa il 5% delle coppie FC che attualmente scelgono l'opzione della diagnosi prenatale potrebbe avvalersi della PGD,ma mancano studi italiani sull' attitudine delle coppie FC a PGD
- 7.3 E' verosimile che le diagnosi prenatali eseguite nelle gravidanze di coppie a rischio elevato per FC siano in un anno in Italia circa 200.
- 7.4 Tra le altre patologie monogeniche, circa 700 all' anno sono le diagnosi prenatali eseguite in gravidanze di coppie a rischio elevato per talassemia
- 7.5 Di massima, si può ipotizzare che vi sarebbe un numero inizialmente basso ma poi progressivamente crescente e non esiguo di richieste di PGD per malattie monogeniche, fra cui la FC.

8. Costi economici

- 8.1 La PGD è una procedura estremamente costosa: ogni ciclo può costare fra i 4000 e i 10000 euro, a seconda, tra l' altro, del numero di embrioni diagnosticati e del tipo di tecnica molecolare necessaria per la diagnosi. Si può valutare, assumendo che una donna si sottoponga in genere ad un secondo ciclo di PGD se il primo fallisce, che il costo medio per ogni gravidanza ottenuta sia di 20000 euro.

9 Aspetti etici e legislativi

- 9.1 La PGD deve essere limitata all'identificazione di condizioni genetiche gravi, per le quali vi è indicazione alla diagnosi prenatale
- 9.2 Non deve essere utilizzata per la selezione di caratteristiche che non siano connesse allo stato di salute
- 9.3 Non deve essere indirizzata all'identificazione del portatore sano di malattie genetiche.
- 9.4 Si discute se sia lecita la selezione negativa dell' embrione identificato portatore sano nel corso di una diagnosi volta ad escludere una malattia genetica
- 9.5 Si discute se la PGD possa essere giustificata per la selezione positiva di un donatore di cellule staminali per una persona affetta da una malattia genetica grave (questa procedura è già stata eseguita in un caso di Anemia di Fanconi ed in uno di Talassemia)
- 9.6 Si discute sull' etica dell'allocazione delle risorse. La PGD è costosa e sperimentale. Si dibatte se sia lecito investire risorse ingenti per questa procedura
- 9.7 Non esistono in Italia norme legislative per PGD o linee-guida scientifiche per PGD. Il disegno di legge n. 514, 18 Giugno 2002, su "Procreazione Medicalmente Assistita", è stato approvato alla camera e verrà ora sottoposto al Senato. In esso si delineano alcune norme per PGD: problema cruciale è il numero di embrioni producibili e la destinazione dei soprannumerari. Francia, Spagna, Svezia, Inghilterra e Belgio hanno una legge che istituzionalizza e regola la PGD. Non è permessa in Austria e Svizzera; in Germania è permessa solo ai fini del diretto beneficio dell' embrione (21,22).

10 Aspetti psicologici

- 10.1. Se sul piano medico la PGD costituisce a volte una soluzione ,estremamente complessa e sofisticata ma pur sempre reale,a problemi di tipo riproduttivo, sul piano dell'immaginario della coppia infertile o con alto rischio di patologia genetica rappresenta un rimedio "esterno " ed a tratti "onnipotente", che consente di superare l' impossibilità o il "divieto" biologico di avere un figlio.
- 10.2. In questo senso le tecniche di procreazione medicalmente assistita comportano rilevanti implicazioni psicologiche a carico della donna che vi si sottopone, della coppia parentale e del figlio nato attraverso queste.
Di qui la necessità che nel corso delle procedure tali implicazioni trovino adeguata identificazione (23,24) e, se necessario, assistenza psicologica specialistica.
- 10.3. Le ricerche condotte evidenziano come la complessità delle procedure evochi nella donna vissuti di profonda incertezza e emozioni ambivalenti, e nella coppia vissuti di incertezza, stress emotivo ma anche sentimenti positivi di speranza e intimità.
- 10.4. In caso di ripetuti infruttuosi tentativi di gravidanza vengono segnalati elevati costi fisici e psichici difficilmente integrabili nell'esperienza della donna.
- 10.5. E' stata riscontrata una correlazione fra strategie di adattamento inefficaci (ansia e/o depressione) e basse quote di concepimento. Invece la riduzione dello stress psicofisico attraverso training comportamentale migliora gli esiti della PGD (25).
- 10.6. Ma d'altro canto viene sottolineato come sia centrale, per chi ricorre alla PGD, la valutazione di maggiore accettabilità dell'impianto di embrioni diagnosticati sani,con selezione di quelli diagnosticati malati, rispetto alla diagnosi prenatale; questa prevede la dolorosa condizione di "gravidanza provvisoria" e l' interruzione della stessa in caso di patologia.
Una storia ostetrica di precedenti interruzioni di gravidanze patologiche e' spesso alla base della richiesta di PGD da parte di coppie ad alto rischio di figli affetti.
- 10.7. La qualità della relazione genitore-bambino (indagata ad oggi fino ad una età massima di 4 anni) è risultata migliore nelle famiglie con figlio nato da procreazione medicalmente assistita rispetto ai gruppi controllo (figli concepiti naturalmente). Rispetto alla presenza di disturbi psicologici, non viene rilevata alcuna differenza tra i gruppi.
- 10.8. Non vi sono ancora però studi che valutino lo sviluppo fisico e psicologico dei nati da PGD nè ricerche relative alla gratificazione e soddisfazione della condizione di genitore ottenuta con PGD, anche tenendo conto dell'incidenza dei limiti della PGD come procedura "sperimentale".

Bibliografia essenziale

- 1) Harper JC et all. "Recent advances and future developments in preimplantation genetic diagnosis". Prenat Diagn 19, 1193-1199,1999
- 2) Handyside AH et all. "Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis". New Engl J Med 327, 905-909, 1992

- 3) Gossens V et al. "Clinical application of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis". *Prenat Diagn* 20, 571-581, 2000
- 4) Wells D. et al. "Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine". *Trends in Molecular Medicine* 1, 23-30, 2001
- 5) Vandervorst M et al. "The Brussels experience of more than 5 years of clinical preimplantation genetic diagnosis". *Hum Reprod Update*, 6, 364-373, 2000
- 6) Geraedts JPM et al. "Preimplantation genetic diagnosis (PGD), a collaborative activity of clinical genetic departments and IVF centers". *Prenat Diagn* 21, 1096-1092, 2001
- 7) Kanavakis E et al. "Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice" *J Med Genet* 39, 6-11, 2002
- 8) Braude P et al. "Preimplantation Genetic Diagnosis". *Nature Rev Genet* 3,941-953,2002
- 9) Van Steirteghem AC et al. "High fertilization and implantation rates after cytoplasmic sperm injection". *Hum Reprod* 8, 1061-1066, 1993
- 10) Liebaers I et al. "Clinical experience with preimplantation genetic diagnosis and intracytoplasmic sperm injection". *Hum Reprod* 13 (suppl.1), 186-195, 1998
- 11) Liu J et al. "Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis F508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm". *JAMA* 23,1858-1860, 1994
- 12) Van De Velde H et al. "Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis". *Prenat Diagn* 20, 1030-1037, 2000
- 13) Hardy K et al. "Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage". *Hum Reprod* 5, 708-714, 1990
- 14) Rechitsky S et al. "Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes". *J Assist Reprod Genet* 16, 192-198, 1999
- 15) Strom CM et al. "Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: the first 109 infants." *Pediatrics* 106, 650-653,2000
- !6) Van Den Abbee E et al. "Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation". *Hum Reprod* 13, 3169-3176, 1997
- 17) Wells D et al. "Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification". *Prenat Diagn* 18, 1389-1401,1998
- 18) Rechitsky S et al. "Allele dropout in polar bodies and blastomeres". *J Assist Reprod Genet* 15, 253-257, 1998

- 19) ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: Data Collection III .Human Reproduction 17,233-246,2002
- 20) Mandy GK et al."Issues and concerns of couples presenting for preimplantation genetic diagnosis (PGD)".Prenat Diagn 22,1117-1122,2002
- 21) Viville S et all. "Results of a survey of the legal status and attitudes towards preimplantation genetic diagnosis conducted in 13 different countries". Prenat Diagn 18, 1347-1380, 1998
- 22) Ferriman A "U.K. approves preimplantation screening technique ". BMJ 323,125, 2001
- 23) Palomba L et all. "Psychological implications and acceptability of preimplantation diagnosis".Hum Reprod 9,1994
- 24) Eugster A et all."Psychological aspects of in vitro fertilization : a review ".Soc Sci Med 48,1999
- 25) Pohl M et all. « Psychoterapeutic counseling and pregnancy rates in vitro fertilization ».J Assist Reprod Genet 16,1999