

JACEK ZAREMBA

Zakład Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii
Al. Sobieskiego 1/9, 02–957 Warszawa

DIAGNOSTYKA PRENATALNA

Badania wykonywane w I i II trymestrze ciąży, mające na celu rozpoznawanie chorób i wad rozwojowych płodu, określa się terminem „diagnostyka prenatalna” (DP). Badania te rozwinęły się na świecie w ciągu trzech ostatnich dziesięcioleci; w Polsce prowadzi się je już od blisko 20 lat.

DP jest wyrazem ogromnego postępu, jaki dokonał się w dziedzinie nauk medycznych, a w szczególności w genetyce człowieka. Od roku 1966 jest możliwe badanie chromosomów płodu w hodowanych amniocytach (komórki pochodzenia płodowego znajdujące się w płynie owodniowym) (STEEL i BREG 1966). W kilka lat później, dzięki postępowi w badaniach biochemicznych, możliwe stało się również rozpoznawanie genetycznie uwarunkowanych defektów metabolicznych płodu, takich jak mukopolisacharydozy (FRATANCONI i współaut. 1969), glikogenozy, jak choroba Pompego (NADLER i MESSINA 1968).

Diagnostyka chorób metabolicznych, takich na przykład, jak wyżej wymienione, polega w głównej mierze na wykrywaniu defektów enzymatycznych, to znaczy na stwierdzeniu braku lub obniżonej aktywności określonych enzymów. Materiał do badań stanowią zazwyczaj hodowane fibroblasty płynu owodniowego lub też inne komórki pochodzenia płodowego. Za miarę aktywności enzymatycznej przyjmuje się ilość substratu właściwego dla określonego enzymu, rozłożonego przez ten enzym w jednostce czasu, w przeliczeniu na jeden gram białka komórkowego. Pomiaru dokonuje się zazwyczaj spektrofotometrycznie. Jako substratu w wielu defektach enzymatycznych używa się fluorogennych, syntetycznych pochodnych 4-metyloumbelliferonu (CZARTORYSKA i współaut. 1993).

Duży postęp w prenatalnym wykrywaniu chorób przyniosły badania molekularne — zwłaszcza analiza DNA, która poczyniła wielkie postępy w ostatnim dziesięcioleciu. Dzięki nim udało się zlokalizować lub nawet sklonować geny szeregu genetycznie uwarunkowanych chorób, na przykład takich, jak mukowiscydoza, dystrofia mięśniowa Duchenne’a, zespół kruchego chromosomu X.

Zastosowanie hybrydyzacji metodą Southerna i reakcji łańcuchowej z polimerazą (ang. polymerase chain reaction — PCR) umożliwiło wykrywanie mutacji wielu chorób. Diagnoza jest stosunkowo prosta w wypadku, gdy gen został już sklonowany i dostępne są sondy cDNA odpowiadające poszczególnym jego odcinkom. W przypadkach, gdy jest znana tylko lokalizacja genu, posługujemy się polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych DNA (ang. restriction

fragment length polymorphism — RFLP) i badamy sprzężenie genu chorobowego z tym polimorfizmem. Zastosowanie powyższych metod przyczyniło się w znacznym stopniu do zwiększenia liczby chorób, które można rozpoznać u płodu lub też po urodzeniu dziecka, często na długo przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby.

Na początku lat siedemdziesiątych ruszyła też diagnostyka prenatalna tak zwanych otwartych wad cewy nerwowej — na podstawie określenia poziomu alfafetoprotein (AFP) i acetylocholinesterazy w płynie owodniowym (BROCK i SCRIMGEOUR 1972, *Collaborative Acetylcholinesterase Study* 1981). W tym samym mniej więcej okresie rozwinęła się ultrasonograficzna diagnostyka wad płodu — zwłaszcza otwartych wad cewy nerwowej (CAMPBELL i współaut. 1972, 1975). Udoskonalona ultrasonografia (USG) pozwala obecnie na wykrycie wielu innych wad rozwojowych płodu — takich jak wady serca, wady twarzoczaszki i kończyn. Od niedawna USG pomaga również w diagnozowaniu niektórych aberracji chromosomowych płodu. Podejrzenie takich zmian może, na przykład, nasunąć obrzęk płodu — jak to często bywa w zespole Turnera, a także — choć w mniejszym stopniu — w zespole Downa i zespole Edwardsa (NICOLAIDES i współaut. 1992, SAVOLDELLI i współaut. 1993). Ponadto USG z reguły stanowi integralną część badania prenatalnego, ponieważ pod jej kontrolą wykonuje się amniocentezę (AMC) inaczej zwaną amniopunkcją — to znaczy nakłucie pęcherza owodniowego przez powłoki brzuszne w celu pobrania próbki płynu owodniowego. AMC wykonywano początkowo tylko w II trymestrze ciąży — zazwyczaj w 15–17 tygodniu; ostatnio wykonuje się już także w okresie wcześniejszym — pomiędzy 12 i 14 tygodniem (tzw. wczesna AMC).

Jako materiał do badań prenatalnych służył początkowo wyłącznie płyn owodniowy i zawarte w nim komórki pochodzenia płodowego, między innymi złuszczone komórki przewodu pokarmowego, moczowego i inne.

W latach osiemdziesiątych jako materiału do badań prenatalnych zaczęto używać komórek pobieranych za pomocą biopsji trofoblastu (BT), którą wykonuje się w I trymestrze ciąży (według terminologii angielskiej chorion villus sampling, CVS). Badanie polega na pobraniu niewielkiej ilości kosmówki (nawet kilku kosmków), która stanowi doskonały materiał do badań cytogenetycznych i biochemicznych, a także do analizy DNA — bez konieczności prowadzenia długotrwałej hodowli komórkowej. Biopsja trofoblastu była poprzedzona eksperymentami w końcu lat sześćdziesiątych i w latach siedemdziesiątych (HANNEMANN i MOHR 1969, KULLANDER i SANDAHL 1973). Ciekawe, że do praktyki weszła najpierw w Chinach, gdzie posługiwano się nią w celu oznaczania płci płodu (Department of Obstetrics and Gynaekology, ANSHAN 1975). Do klinicznej diagnostyki prenatalnej weszła jednak dopiero w latach osiemdziesiątych, stosowana w szczególności do badań cytogenetycznych (NIAZI i współaut. 1981), oznaczania poziomu aktywności niektórych enzymów oraz płci płodu (KAZY i współaut. 1982) i do rozpoznawania niektórych hemoglobinopatii za pomocą analizy DNA (WILLIAMSON i współaut. 1981, OLD i współaut. 1982). Wykazano, że z kosmków trofoblastu można uzyskać kariotyp płodu już w kilka godzin po pobraniu materiału (SIMONI i współaut. 1983, RODECK i MORSMAN 1983); metoda ta jest tańsza niż amniocenteza, ponieważ oszczędza się tu na kosztownych pożywkach używanych przy kilkutygodniowej hodowli komórek płynu owodnio-

wego. BT wykonuje się pomiędzy 8 i 10 tygodniem ciąży, za pomocą specjalnego cewnika wprowadzonego przez szyjkę macicy lub biopsji igłowej przez powłoki brzuszne, co pozwala na znacznie wcześniejsze niż przy AMC uzyskanie wyników badania. Wadą tej metody jest wyższe ryzyko poronienia niż przy amniocentezie, częstsze artefakty — a więc błędne wyniki — w badaniu cytogenetycznym i, jak niedawno stwierdzono, częstsze występowanie niektórych zaburzeń rozwojowych płodu będących najpewniej następstwem BT — zwłaszcza wykonanej wcześniej, to jest około 8 tygodnia ciąży (FIRTH i współaut. 1991). Metoda ta nie znajduje zastosowania w badaniach biochemicznych, w których materiałem jest płyn owodniowy — na przykład w przypadkach podejrzenia wad otwartych cewy nerwowej.

Obie metody, AMC i BT, są bardzo przydatne i wzajemnie uzupełniają się. Obecnie istnieje tendencja, ażeby BT wykonywać w przypadkach, w których ryzyko urodzenia dziecka chorego jest szczególnie wysokie — na przykład w niektórych chorobach uwarunkowanych monogenicznie, które rozpoznaje się na podstawie oznaczania aktywności enzymatycznej w tkankach pochodzenia płodowego bądź też na podstawie analizy DNA. W większości pozostałych przypadków korzysta się raczej z wczesnej amniocentezy.

Cenną metodą badania jest pobranie próbki krwi płodowej poprzez nakłucie żyły pępowinowej — czyli tak zwaną kordocentezę — oczywiście pod kontrolą USG. Metoda ta znajduje zastosowanie w przypadkach bardziej zaawansowanej ciąży (około 18–20 tygodnia), zwłaszcza wówczas, gdy zachodzi konieczność weryfikacji wątpliwego wyniku badania lub późnego wykonania badania cytogenetycznego — zazwyczaj w związku ze zbyt późnym skierowaniem pacjentki na badanie.

Jedną z metod była do niedawna fetoskopia z użyciem cienkiego fibroskopu igłowego (ang. needlescope) (RODECK i NICOLAIDES 1983). Metoda ta pozwala na obejrzenie płodu, wykrycie niektórych wad rozwojowych, pobranie próbki krwi pępowinowej, biopsję skóry, biopsję wątroby płodu. Obecnie jednak w związku ze stosunkowo dużym ryzykiem zabiegu (przynajmniej około 5%) fetoskopia wychodzi z użycia jako metoda zbyt inwazyjna i ryzykowna; zastępuje ją skutecznie udoskonalona USG.

WSKAZANIA

Najważniejsze wskazania do badań prenatalnych zestawiono w tabeli 1. Wskazania „cytogenetyczne” ustala się w przypadkach, w których istnieje zwiększone ryzyko urodzenia dziecka z aberracją chromosomową. Najczęstszym wskazaniem w tej grupie jest zaawansowany wiek kobiety, ryzyko urodzenia dziecka z aberracją chromosomową wzrasta bowiem wyraźnie wraz z wiekiem matki. Ogólnie przyjmuje się, że badanie prenatalne należy proponować kobietom począwszy od 35 roku życia, to jest wówczas, gdy ryzyko urodzenia dziecka z zespołem Downa lub inną aberracją chromosomową zbliża się do 1:300. Ryzyko takie uważa się też za wartość progową przy kwalifikowaniu do badania prenatalnego kobiet na podstawie wyników badań przesiewowych (patrz niżej).

Tabela 1

Wskazania do badań prenatalnych (amniocentezy, biopsji trofoblastu lub kordocentezy)

Wskazania	Ryzyko urodzenia dziecka chorego
— Wiek matki 35 lat i powyżej	≥ 1 : 300 (patrz tabela 2)
— Poprzednie urodzenie dziecka z zespołem Downa lub inną aberracją chromosomową	0,5% do 1,4%
— Translokacje chromosomowe występujące rodzinnie	różne w zależności od rodzaju translokacji i objętych nią chromosomów
— Zmiany wykryte USG nasuwające podejrzenie aberracji chromosomowych płodu	około 10%
— Poprzednie urodzenie dziecka z chorobą monogeniczną, np. chorobą metaboliczną, jak mukopolisacharydoza, lipidoza i inne	25% do 50% (patrz tabela 3)
— Poprzednie urodzenie dziecka z otwartą wadą cewy nerwowej, jak przepuklina rdzeniowa, przepuklina mózgowia, bezmózgowie	3% do 5% (o ile dana osoba urodziła więcej niż jedno dziecko z taką wadą ryzyko wynosi 10% lub więcej)
— Wynik testu przesiewowego wskazujący na zwiększone ryzyko urodzenia dziecka chorego	≥ 1 : 300*

*Dotyczy aberracji chromosomowych płodu.

W tabeli 2 podano wartości ryzyka urodzenia dziecka z zespołem Downa (trisomia chromosomu 21) — najczęstszą aberracją chromosomową — w zależności od wieku matki. Do innych wskazań cytogenetycznych należą:

— Poprzednie urodzenie dziecka z aberracją chromosomową; w odniesieniu do zespołu Downa wynosi ono około 0,5%, a w przeliczeniu na wszystkie aberracje chromosomowe łącznie 1,4% (STENE i współaut. 1984).

— Rodzinnie występujące translokacje chromosomowe lub też inne zrównoważone zmiany strukturalne chromosomów. Ryzyko w przypadkach translokacji wymiennych waha się znacznie — zależnie od chromosomów i ich odcinków, które uległy przemieszczeniu.

— Zmiany w USG nasuwające podejrzenie aberracji chromosomowych płodu. Na przykład pogrubienie fałdu skórniego na karku płodu (objaw związany ze wspomnianym wyżej obrzękiem płodu) uważa się obecnie za cechę charakterystyczną dla zespołu Downa, i w związku z tym za wskazanie do AMC lub BT (NICOLAIDES i współaut. 1992).

Wśród pozostałych wskazań do diagnozy prenatalnej znajdują się:

— Zwiększone ryzyko urodzenia dziecka z chorobą monogeniczną.

Przykłady takich chorób — dziedziczących się zgodnie z prawami Mendla — podano w tabeli 3. Diagnostyka prenatalna w takich przypadkach polega na badaniu produktu genu, na przykład, na określeniu aktywności jednego z enzymów lub też na analizie samego materiału genetycznego, to jest DNA.

— Poprzednie urodzenie dziecka z otwartą wadą cewy nerwowej.

Jest to wada uwarunkowana wieloczynnikowo; rozpoznanie można ustalić na podstawie badania USG płodu lub też stwierdzenia w płynie owodniowym obecności lub podwyższonego poziomu takich markerów biochemicznych, jak wspomniana wyżej AFP lub acetylocholinesteraza.

— Wynik testu przesiewowego wskazujący na zwiększone ryzyko urodzenia dziecka chorego.

Tabela 2

Częstość* występowania zespołu Downa w zależności od wieku matki (HOOK I LINDSJÖ 1978)

WM	Częstość	WM	Częstość	WM	Częstość
20	1/1923	30	1/885	40	1/109
21	1/1695	31	1/826	41	1/85
22	1/1538	32	1/725	42	1/67
23	1/1408	33	1/592	43	1/53
24	1/1299	34	1/465	44	1/41
25	1/1205	35	1/365	45	1/32
26	1/1124	36	1/287	46	1/25
27	1/1053	37	1/225	47	1/20
28	1/990	38	1/176	48	1/16
29	1/935	39	1/139	49	1/12

WM — wiek matki

*Częstość występowania wśród żywo urodzonych noworodków = ryzyko urodzenia dziecka z zespołem Downa

Tabela 3

Przykłady chorób monogenicznych, które można rozpoznać u płodu

Nazwa choroby i sposób dziedziczenia		Wysokość ryzyka	Sposób diagnozowania	Materiał
Choroba Tay'a i Sachsa (gangliozydoza GM2)	R-A	25%	określenie aktywności beta-heksozoaminidazy A	trofoblast amniocyty
Choroba Hurler (mukopolisacharydoza)	R-A	25%	określenie aktywności alfa-iduronidazy	trofoblast amniocyty płyn owodniowy**
Mukowiscydoza	R-A *	25%	analiza DNA	trofoblast amniocyty
Zespół kruchego chromosomu X	D-X	50%*	analiza DNA badanie cytogenetyczne	trofoblast amniocyty
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a/Beckera	R-X	50%(M)	analiza DNA	trofoblast amniocyty
Choroba Huntingtona	D-A	50%	analiza DNA	trofoblast amniocyty

R-A — dziedziczenie recesywne autosomalne

D-A — dziedziczenie dominujące autosomalne

R-X — dziedziczenie recesywne sprzężone z płcią

D-X — dziedziczenie dominujące sprzężone z płcią

(M) — dotyczy tylko potomstwa płci męskiej

* — ryzyko zbliżone do 50% dotyczy tylko mężczyzn, u kobiet-heterozygot ryzyko jest niższe (niepełna penetracja genu chorobowego)

** — podwyższony poziom mukopolisacharydów w płynie owodniowym

Badania przesiewowe ukierunkowane na wykrywanie otwartej wady cewy nerwowej były prowadzone już w latach 70-tych. Polegały one na określaniu poziomu AFP w surowicy krwi kobiet w 16–18 tygodniu ciąży. W przypadku istnienia tego typu wad u płodu poziom AFP w surowicy krwi matek jest znamienne podwyższony. U kobiet takich wykonywano dokładne badanie USG i AMC, co w efekcie pozwoliło na znaczną redukcję urodzeń dzieci z otwartą wadą cewy nerwowej — w Szkocji zanotowano spadek o 72% do 83% (FERGUSON-SMITH 1983). W końcu lat 80-tych okazało się, że w zespole Downa i innych aberracjach chromosomowych poziom AFP w surowicy krwi matek jest obniżony. Stwierdza się ponadto obniżenie poziomu nie związanego estriolu (uE3) i podwyższenie poziomu gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Wszystkie te markery: AFP, uE3 i hCG w surowicy krwi matki oraz dodatkowo wiek matki są obecnie wykorzystywane w teście przesiewowym ukierunkowanym na wykrywanie zespołu Downa i innych aberracji chromosomowych. Dzięki temu testowi wykrywalność zespołu Downa może przekroczyć 60% (WALD i współaut. 1988). Jest to bardzo dużo, jeśli się zważy, że kwalifikowanie do badań prenatalnych kobiet na podstawie kryterium wieku — 35 lat lub powyżej — w najlepszym wypadku pozwala na wykrycie 30% przypadków zespołu Downa.

— Są jeszcze inne wskazania do badań prenatalnych. Jednym z nich jest nerwica lękowa o znacznym nasileniu. Wykonanie badania prenatalnego u takich kobiet uwalnia je od lęku i w ten sposób może przyczynić się do uchronienia ciąży. Badania prenatalne dzięki wprowadzaniu nowych metod są nieustannie udoskonalane. Wspomnianą wyżej technikę PCR wykorzystano ostatnio do wykrywania defektów genetycznych — takich na przykład jak mukowiscydoza — nawet w pojedynczych komórkach. Zarysowują się więc możliwości preimtanplantacyjnej diagnozy prenatalnej (WU i współaut. 1993).

Badania prenatalne obecnej doby prowadzi się głównie pod kątem wykrywania ciężkich i nieuleczalnych chorób płodu. W razie wykrycia jednej z takich chorób matka ma prawo zadecydować o dalszych losach ciąży. W większości takich przypadków dochodzi do przerwania ciąży ze wskazań lekarskich.

W Polsce badania prenatalne są wykonywane na bardzo małą skalę i tylko w kilku ośrodkach. Badania przesiewowe oparte na oznaczaniu wymienionych wyżej markerów biochemicznych w surowicy matki nie są dotychczas prowadzone. W Polsce, podobnie jak w większości innych krajów, najczęstszym wskazaniem do diagnostyki prenatalnej jest zaawansowany wiek matki. Biorąc pod uwagę wszystkie wskazania do badań prenatalnych łącznie chorobę lub wadę płodu rozpoznaje się tylko w 3% do 4% przypadków. Pozostałe 96%–97% kobiet dowiaduje się natomiast o prawidłowym wyniku badania i decyduje się na urodzenie dziecka.

PRENATAL DIAGNOSIS

Summary

Short history of the prenatal diagnosis, categories of the risk and indications as well as new trends are briefly discussed. The paper ends with a few remarks about the situation in Poland, characterised by: too small number of genetic centers performing prenatal diagnosis, too small number of tests carried out and the maternal blood serum screening test not being applied so far.

LITERATURA

- BROCK D. J. H., SCRIMGEOUR J. B., 1972. *Early prenatal diagnosis of anencephaly*. Lancet, 2, 1252-1253.
- CAMPBELL S., JOHNSTONE F. D., HOLT E. M., MAY P., 1972. *Anencephaly: Early ultrasonic diagnosis and active management*. Lancet, 2 1226-1227.
- CAMPBELL S., PRYSE-DAVIES J., COLTART T. M., SELLER M. J., SINGER J. D., 1975. *Ultrasound in the diagnosis of spina bifida*. Lancet, 1, 1065-1066.
- Collaborative Acetylcholinesterase Study*, 1981. Lancet, 2, 321-324.
- CZARTORYSKA B., GÓRSKA D., SZIRKOWIEC-GMURCZYK W., 1993. *Aktywność enzymów lizosomalnych w leukocytach krwi pacjentów z różnymi postępującymi chorobami neurologicznymi o niewyjaśnionej etiologii*. Diagn. lab., 29, 407-414.
- Department of Obstetrics and Gynaecology*, Anshan, 1975. *Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy*. Chinese Med. J. 1, 117-126.
- FERGUSON-SMITH M. A., 1983. *The reduction of anencephalic and spina bifida births by maternal serum alpha-fetoprotein screening*. Brit. Med. Bull., 39, 365-372.
- FIRTH H. V., BOYD P. A., CHAMBERLAIN P., MACKENZIE I. Z., LINDEMBAUM R. H., HUSON S. M., 1991. *Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days gestation*. Lancet, 337, 762-763.
- FRATANCONI J. C., HALL C. W., NEUFELD E. F., 1968. *The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharide*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 699-706.
- HAHNEMANN N., MOHR J., 1969. *Antenatal fetal diagnosis in genetic disease*. Bull. Eur. Soc. Hum. Genet. 3, 47-54.
- HOOKE E. B., LINDSJÖ A., 1978. *Down's syndrome in live births by a single-year maternal age interval in a Swedish study: comparison with results from a New York study*. Am. J. Hum. Genet. 30, 19-27.
- KAZY Z., ROSOVSKY I. S., BAKHAREV V. A., 1982. *Chorion biopsy in early pregnancy: a method of early prenatal diagnosis for inherited disorders*. Prenat. Diagn. 2, 39-45.
- KULLANDER S., SANDAHL B., 1973. *Fetal chromosome analysis after transvisceral placental biopsies during early pregnancy*. Acta Obstet. Gynec. Scand. 52, 355-359.
- NADLER H. L., MESSINA A. M., 1969. *In-utero detection of type II glycogenosis (Pompe's disease)*. Lancet, 2, 1277-1278.
- NAZI M., COLEMAN D. V., LOEFFLER F. E., 1981. *Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi*. Brit. J. Obstet. Gynaec., 88, 1081-1085.
- NICOLAIDES K. H., AZAR G., BYRNE D., MANSUR C., MARKS K., 1992. *Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy*. Br. Med. J., 304, 867-869.
- OLD J. M., WARD R. H. T., KARAGOZLU F., PETRON M., MODEL B., WEATHERALL D. J., 1982. *First trimester fetal diagnosis for haemoglobinopathies: 3 cases*. Lancet 2, 1414-1416.
- RODECK C. H., MORSMAN J. M., 1983. *First-trimester chorion biopsy*. Brit. Med. Bull. 39, 338-342.
- RODECK C. H., NICOLAIDES K. H., 1983. *Fetoscopy and fetal tissue sampling*. Brit. Med. Bull., 39, 332-337.
- SAVOLDELLI G., BINLEWT F., ACHERMANN J., SCHMID W., 1993. *Ultrasound screening for chromosomal anomalies in the first trimester of pregnancy*. Prenat. Diagn., 13, 513-518.
- SIMONI G., BRAMBATI B., DANESINO C., ROSELLA F., TERZOLI G. L., FERRARI M., FRACCARO M., 1983. *Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy*. Hum. Genet. 64, 349-357.
- STEEL M. W., BREG W. R., 1966. *Chromosome analysis of human amniotic cells*. Lancet 1, 383-385.
- STENE J., STENE E., MIKKELSEN M., 1984. *Risk for chromosome abnormality at amniocentesis following a child with a non-inherited chromosome aberration. A European Collaborative Study on Prenatal Diagnosis 1981*. Prenat. Diagn. 4, Spec. No., 81-95.
- WALD N. J., CUCLE H. S., DENSEM J. W., NANCHAHAL K., ROYSTON P., CHARD T., HADDOW J. E., KNIGHT G. J., PALOMAKI G. E., CANICK J. A., 1988. *Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy*. Br. Med. J., 297, 883-887.
- WILLIAMSON R., ESKDALE J., COLEMAN D. V., NAZI M., LOEFFLER F. E., MODEL B. M., 1981. *Direct gene analysis of chorionic villi. A possible technique for first trimester antenatal diagnosis of haemoglobinopathy*. Lancet 2, 1125-1127.

WU R., CUPPENS H., BUYSE I., DECORTE R., MARYNEN P., GORDS P., CASSIMAN J. J., 1993. *Co-amplification of the sequence in single cell PCR: Implications for improved assessment of polar bodies and blastomeres in preimplantation diagnosis.* Prenat. Diagn., 13, 1111-1122.