

ارزیابی مؤلفه‌های تست‌های ژنتیکی

● دکتر شهرام نعمتی

دکترای علوم آزمایشگاهی، دکترای تخصصی (PhD) ژنتیک پزشکی

□ خلاصه

تست‌های ژنتیکی به جهت یافتن تغییرات در سطح ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای دستیابی به این اطلاعات روش‌های مختلفی طراحی شده است که تغییرات فوق را در سطح کروموزوم، ژن و یا حتی پروتئین مورد مطالعه قرار می‌دهند. در همین ارتباط در سال ۲۰۰۰ به مدت چهار سال پروژه‌ای به نام ACCE در مرکز مبارزه و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC) با هدف ارزیابی اطلاعات به دست آمده از آزمایش‌ها مبتنی بر DNA راه اندازی گردید. در این مطالعه ارزش داده‌ای حاصل از تست ژنتیکی در چهار حوزه مشتمل بر (Analytic validity)، اعتبار سنجی بالینی (Clinical validity)، کاربردپذیری بالینی (Clinical utility) و جنبه‌های اخلاقی، قانونی و اجتماعی (Ethical, legal & social implication) مورد بررسی قرار گرفته شده است. در این مرور سعی شده است تا با توضیح دقیق مفاهیم فوق به نقش و اهمیت شناخت کافی از اجزای تست‌های ژنتیکی در اثر بخشی آن و همچنین متغیرهایی که بایستی به هنگام انتخاب و تفسیر تست ژنتیکی در نظر داشت، تاکید گردد.

کلمات کلیدی: تست‌های ژنتیکی، اعتبار سنجی روش

آزمایش، اعتبار سنجی بالینی آزمایش، کاربرد سنجی بالینی آزمایش

□ ۱. تست ژنتیکی

۱-۱. تعریف

بر اساس تعریف NIH^۱ تست ژنتیکی یک آزمایش پزشکی است که به جهت تعیین تغییرات در کروموزوم، ژن و یا پروتئین انجام می‌گردد. نتیجه این دست از آزمایش‌ها موجب تأیید و یا رد بیماری ژنتیکی شده و همچنین احتمال ابتلا و انتقال بیماری ژنتیکی را در فرد تعیین می‌نماید. روش‌های متفاوتی برای انجام تست‌های ژنتیکی وجود دارد که به طور کلی در سه گروه تقسیم می‌شوند.

۱- تست‌های ژنتیک مولکولی که تغییرات و جهش‌ها را که می‌توانند موجب ایجاد بیماری شوند را در ژن‌ها مورد بررسی قرار می‌دهند.

۲- تست‌های ژنتیکی کروموزومی که طی آن تغییراتی که در سطح کروموزوم می‌تواند منجر به بیماری شود را مورد بررسی قرار می‌دهند.

1- National Institute of Health



۳- تست‌های ژنتیکی بیوشیمیایی که طی آن تغییرات کمی و یا کیفی در سطح پروتئین، به جهت ارزیابی جهش در سطح DNA، انجام می‌گردد.

می‌توان انتظار داشت که در آینده تعریف این دست از تست‌ها تغییر نموده و به کلیه اقداماتی پزشکی اطلاق شود که به واسطه آن بتوان تغییرات منتج به بیماری را در سطح ژنوم تأیید یا رد نمود.

۲-۱. انواع تست‌های ژنتیکی

از آنجایی که نمی‌توان تنها به واسطه یک نوع تست تمامی تغییرات ژنتیکی را شناسایی نمود، تنوع زیادی در انواع تست‌های ژنتیکی ایجاد شده تا بر اساس شرایط بیماری، پزشکی و خانوادگی فرد بتوان رویکرد مناسب را به کار بست.

۱-۲-۱. تست‌های تک ژنی

در این حالت تنها یک ژن به جهت تشخیص شرایط موجود در فرد مورد مطالعه^۲ و یا افراد خانواده وی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مانند آنمی سلول‌های داسی شکل و یا دیستروفی عضلانی دوشن.

۲-۲-۱. تست‌های پانلی

در بیماری‌هایی که نقص در عملکرد چندین ژن در بیماری‌زایی آن‌ها شناخته شده به جهت سهولت، سرعت بالا و قیمت تمام شده پایین، پانل‌هایی طراحی شده است تا به واسطه آن بتوان به طور همزمان جهش‌ها را در چندین ژن مورد مطالعه قرار داد. از این نوع تست‌ها می‌توان به پانل‌های تشخیصی سرطان ریه، کولورکتال، سینه و همچنین اشکال تک ژنی بیماری التهابی دستگاه گوارش با شروع زود هنگام^۳ اشاره نمود.

۳-۲-۱. تست‌های ژنتیکی با گستره بالا^۴

این گروه به دو بخش اصلی تقسیم می‌شوند:

۱-۲-۳-۱. تعیین توالی اگزوم: در این حالت تمامی اگزون‌های موجود در ژنوم و یا آن بخشی که در ارتباط با ایجاد بیماری‌ها شناخته شده‌اند مورد بررسی قرار می‌گیرند.
۱-۲-۳-۲. تعیین توالی کل ژنوم: در این حالت کل ژنوم فرد که شامل مناطق کد کننده و به ظاهر تنظیمی (غیر کد کننده) می‌باشد مورد بررسی قرار می‌گیرد. معمولاً از این نوع تست در مواقعی که اطلاعات محدودی در خصوص نقش عناصر ژنتیکی در ایجاد بیماری وجود داشته و به منظور شناسایی آن‌ها انجام می‌پذیرد. برای مثال اختلالات رشدی^۵ در ماه‌ها و سال‌های ابتدایی تولد را می‌توان در این گروه قرار داد.

۱-۲-۳-۳. سایر تست‌ها

همانطور که در تعریف تست ژنتیکی نیز به آن اشاره شد، تست‌های ژنتیکی می‌تواند در سطح کروموزوم (کاریوتایپ) پروتئین و یا از طریق ارزیابی بیان ژن انجام گردد. موارد اخیر نقش مهمی در حوزه‌های تحقیقاتی (بررسی اثرات جهش از طریق مطالعات عملکردی^۶) و بالینی (تعیین استراتژی‌های درمانی بر اساس بیان پروتئین‌های خاص در سرطان‌ها) ایفا می‌نمایند. برای مثال صرف وجود یک واریانت، تغییر در نوکلئوتید، به تنهایی بیانگر رخداد جهشی که بتواند بر روی عملکرد ژن اثر بگذارد، نخواهد بود. لذا به جهت ارزیابی اهمیت این دست از تغییرات در صورتیکه قبلاً نیز مورد مشابه ای گزارش نشده باشد، انجام مطالعات عملکردی است. در این دست از مطالعات آثار تغییرات را مثلاً در سطح سلول مورد بررسی قرار می‌دهند. به طور مثال در صورتیکه واریانت در یک گیرنده در سطح سلول گزارش شود، اثرات آن را از طریق تحریک گیرنده با لیگاند مرتبط و بررسی فعالیت مسیرهای پایین دستی گیرنده انجام می‌دهند. اگر فعالیت مسیرهای پایین دستی طبیعی

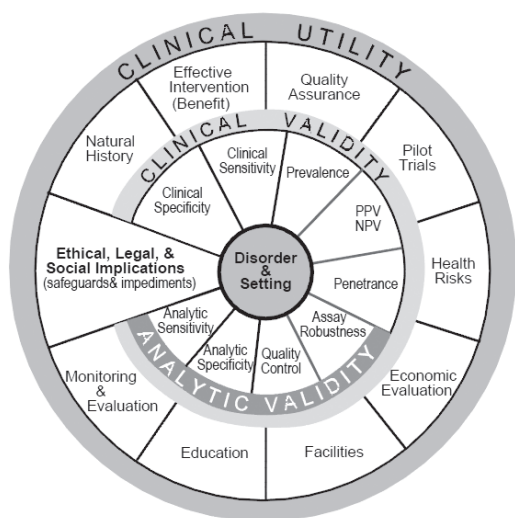
2- Proband

3- Very Early Onset- Inflammatory Bowel Disease (VEO-IBD)

4- Large-Scale genetic or genomic testings

5- Developmental delay

6- Functional Studies



شکل ۱. فرآیند ارزیابی ACCE در قالب ۵ جز آن در شکل نشان داده شده است.

۱-۳-۱. اعتبار روش آزمایش^۹

توانمندی و قابلیت تست ژنتیکی به جهت تعیین صحیح ژنوتیپ مورد بررسی، اعتبار روش را تعریف می‌نماید. همانطوری که در شکل ۱ می‌توان مشاهده نمود چهار جز اصلی در تعیین میزان اعتبار روش شامل:

۱- حساسیت^{۱۰} که در حقیقت مبین قابلیت روش به جهت یافتن ژنوتیپ مورد نظر می‌باشد.

۲- اختصاصیت^{۱۱} قابلیت تست به جهت تعیین مواردی است که حاوی واریانت و یا جهش مورد جستجو نباشند.

۳- فرآیند کنترل کیفیت به جهت ارزیابی نتایج و کسب اطمینان از صحت آن انجام می‌گیرد.

۴- ثبات روش^{۱۲} مرتبط با متغیرهای داخلی (قبل و در حین آزمایش) که می‌تواند بر روی نتایج تأثیر بگذارد و بایستی شناخته شوند.

بود می‌توان چنین پنداشت که تغییر فوق با اثر پاتولوژیکی همراه نبوده است.

از طرف دیگر ارزیابی بیان ژن‌ها و استفاده آن در درمان اساس پزشکی فردی را تشکیل می‌دهد. برای مثال افزایش بیان پروتئین Her2/neu که در حقیقت یک گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال بوده در افزایش میزان تکثیر سلول نقش مهمی داشته و در سرطان سینه اندکسی به جهت استفاده از داروی هرسپتین^۷، منوکلونال آنتی بادی، می‌باشد.

۱-۳-۲. ارزیابی معیارهای انتخاب تست‌های ژنتیکی

قابلیت تست‌های ژنتیکی در ارائه اطلاعات صحیح و به تبع آن تأثیر گذار در روند بیماری به عوامل متعددی از قبیل نوع تست، چهارچوب مطالعه (تست تشخیصی، تست غربالگری نوزاد، غربالگری حین بارداری و یا غربالگری خانوادگی) نوع بیماری (تک ژنی، چند ژنی)، عوامل اپیدمیولوژیکی همچون شیوع بیماری و سایر موارد دیگر بستگی دارد. به همین جهت قبل از انتخاب تست ژنتیکی بایستی معیارهای تعیین کننده توانمندی و قابلیت تست مورد ارزیابی قرار گیرد، تا بر اساس آن به کار گرفته شود. در همین ارتباط از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۴ مرکز کنترل و پیشگیری^۸ از بیماری‌ها پروژه‌ای به نام ACCE با هدف ارزیابی اطلاعات به دست آمده از تست‌های مبتنی بر DNA انجام داد که از آن می‌توان به عنوان مدلی برای ارزیابی سایر تست‌ها ژنتیکی استفاده نمود.

حروف تشکیل دهنده ACCE در حقیقت مخفف واژه‌های تکنیکی مشتمل بر اعتبار روش (Analytic Validity)، اعتبار سنجی بالینی (Clinical validity)، فواید بالینی (Clinical utility) و جنبه‌های اخلاقی، قانونی و اجتماعی (Ethical, legal & social implication) تست می‌باشد که به جهت ارزیابی تست، مورد استفاده قرار می‌گیرند که در ادامه با جزئیات بیشتر به آن خواهیم پرداخت.

7- Herceptin

8- Center for Disease Control and Prevention

9- Analytic validity

10- Sensitivity

11- Specificity

12- Robustness





بایستی در تفسیر تست مد نظر قراردادده شود.

□ ۲- اختصاصیت بالینی^{۱۷}

قابلیت روش در شناسایی افرادی با ژنوتیپ منفی (از نظر واریانت و یا موتاسیون مورد بررسی) که فنوتیپ مورد مطالعه را نداشته و در آینده نیز از خود بروز ندهند.

□ ۳- ارزش پیشگویی کنندگی مثبت^{۱۸} و منفی^{۱۹}

ارزش پیشگویی کننده تست‌ها از اجزای مهم‌تر اعتبار بالینی تست می‌باشد. که به واسطه آن پزشک می‌تواند به چه میزان بر اساس جواب اولیه تست وجود بیماری را تأیید (PPV) و یا رد (NPV) نماید. در مواردی که حساسیت روش انجام تست و نفوذ^{۲۰} ژن (عنوان بعدی) بالا باشد ارزش پیشگویی کنندگی تست‌ها نیز بالا خواهد بود. از طرف دیگر فراوانی بیماری و نفوذ ژن اثرات مهمی بر روی ارزش پیشگویی کنندگی مثبت و اختصاصیت بالینی خواهد داشت. این مسئله حداقل در بخشی به این علت است که در مواردی که میزان اشتباهات مراحل انجام تست پایین باشد این دست از خطا در بیماری‌هایی که فراوانی پایینی دارند موجب انحراف قابل توجهی در ارزش پیشگویی کنندگی مثبت تست و اختصاصیت بالینی گردد. از طرف دیگر همچنان که قبلاً نیز به آن اشاره شد در مواردی که آلل فراوانی ژن مورد بررسی در جمعیت مورد مطالعه پایین باشد، به دلیل حساسیت پایین روش در شناسایی ژنوتیپ مورد نظر، ارزش پیشگویی کنندگی منفی تست در آن جمعیت و قوم پایین خواهد بود. در چنین مواردی

۱-۳-۲. اعتبار بالینی^{۱۳}

قابلیت تست که بتوان به وسیله آن شرایط بالینی مورد نظر را تعیین و یا پیشگویی نمود، اعتبار بالینی گفته می‌شود. به عبارت دیگر به چه میزان ژنوتیپ تعیین شده با فنوتیپ فرد مطابقت داشته که به نوبه خود در ارتباط با میزان همراهی ژنوتیپ با فنوتیپ و همچنین مناسب بودن روش آزمایش خواهد بود. این شاخص برای تست‌های تشخیصی به خوبی قابل استفاده می‌باشد ولی برای تست‌های که به جهت بررسی احتمال وقوع بیماری در آینده انجام می‌شوند^{۱۴} به دلایلی (از جمله نفوذ ژن) با چالش‌هایی همراه خواهد بود که در ادامه به آن اشاره می‌شود. اعتبار بالینی یک تست ژنتیکی در بستر بخش‌های ذیل مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (شکل).

□ ۱- حساسیت بالینی^{۱۵}

قابلیت روش در شناسایی افرادی است که با ژنوتیپ مورد نظر (حاوی واریانت و یا موتاسیون مورد جستجو)، یا فنوتیپ مربوطه را داشته و یا در آینده خواهند داشت. به عبارت دیگر توانمندی روش ژنتیکی در شناسایی افراد با صفت (بیماری) خاص از طریق شناسایی ژنوتیپ مربوطه خواهد بود. نکته قابل توجه اینکه در بسیاری از تست‌های ژنتیک میزان حساسیت بالینی به دلیل فراوانی متفاوت آلل^{۱۶} که خود می‌تواند به دلیل ساختار قومیت جمعیت آن منطقه باشد، تقلیل یابد. در این حالت علیرغم آنکه حساسیت روش برای هدف (ژن) مورد بررسی می‌تواند بالا باشد، ولی حساسیت بالینی آن پایین خواهد بود. که البته

13- Clinical validity

14- Predictive tests

15- Clinical sensitivity

16- Allele frequency

17- Clinical specificity

18- Positive predictive value (PPV).

19- Negative predictive value (NPV).

20- Penetrance



می‌توان با تغییر نوع تست مثلاً از روش‌های محدود به یک ژن به روش‌های بررسی همزمان چند ژن (تست‌های پانلی) و یا حتی روش‌های تعیین توالی نسل جدید^{۲۱} به جهت ارزیابی وجود جهش‌های احتمالی در سطح اگزون‌ها و یا کل ژنوم، حساسیت روش را بالا برد. هر چند در این دست از روش‌ها نیز در مواردی محدودیت‌های در تفسیر و اهمیت واریانت گزارش شده به ویژه در خصوص بیماری‌های نادر وجود خواهد داشت که در صورت امکان از طریق مطالعات عملکردی^{۲۲} بایستی بدان پاسخ داد.

همچنین می‌توان انتظار داشت در صورتی که در پاتوژن بیماری جهش‌های مختلف در یک ژن^{۲۳} و یا ژن‌های مختلف وجود داشته باشد نیز اختصاصیت بالینی روش آزمایشگاهی کاهش یابد. لذا لازم است در طراحی روش‌های آزمایشگاهی اطلاعات بالینی حاصل از کارآزمایی‌های بالینی و یافته‌های مولکولی مرتبط با بیماری مد نظر قرار گیرد.

□ ۴- نفوذ^{۲۴}

بنابیه تعریف نفوذ یک صفت^{۲۵} برای یک ژنوتیپ معین، احتمال بروز آن صفت (فنوتیپ) در فرد حامل آن ژنوتیپ می‌باشد. همانطور که پیش‌تر به آن نیز اشاره شد در نظر گرفتن میزان نفوذ ژن در تفسیر و ارزیابی تست به جهت استفاده در انواع مطالعات بالینی^{۲۶} بسیار ضروری می‌باشد.

□ ۵- شیوع^{۲۷}

به فراوانی بیماری در جمعیت مورد مطالعه اطلاق می‌شود.

میزان فراوانی یک ژنوتیپ در جمعیت رابطه معکوس با میزان اختصاصیت بالینی تست دارد. که همانطوریکه پیش‌تر به آن اشاره شد می‌تواند با ناهمگنی آلی و لوکوسی در ارتباط باشد.

علاوه بر متغیرهایی که در بالا به آن اشاره شد و بایستی به هنگام ارزیابی اعتبار بالینی تست در نظر گرفته شود، عوامل محیطی و ساختار ژنتیک انسانی که می‌تواند بالقوه حاوی ژن‌های تنظیم کننده^{۲۸} باشد می‌تواند بر روی اعتبار بالینی (به خصوص از طریق اثر بر نفوذ ژن) تست تأثیر بگذارد. انجام کارآزمایی‌های بالینی (موردی-شاهدی^{۲۹}) می‌تواند در رفع ابهامات مرتبط مؤثر واقع شوند.

لذا بایستی توجه داشت که در اعتبار سنجی بالینی یک تست ژنتیکی، جمعیت مورد مطالعه (آیا تست بر روی جمعیت نرمال انجام می‌گیرد و یا بر روی خانوادهایی که بیماری با فراوانی بالا در آن‌ها گزارش شده است)، نوع تست آزمایشگاهی مورد استفاده (آیا تست محدود به یک، چند و یا کل ژن‌ها می‌باشد) و نوع تظاهرات بیماری (چه آن دسته که در ظاهر قابل رویت باشد و یا نیز به انجام اقدام تشخیصی تکمیلی داشته باشد) که مبنای تشخیص بیماری قرار می‌گیرد، بسیار مهم و ارزشمند خواهد بود.

۱-۳-۳. کاربردپذیری بالینی^{۳۰}

کاربرد پذیری یک تست ژنتیکی به دنبال ارزیابی کلیه عناصر و عواملی است که بر استفاده آن در بالین تأثیر گذار می‌باشد. به خصوص تأثیر انجام تست بر روی نتیجه‌نهایی

21- Next generation sequencing(NGS)

22- Functional studies

23- Allelic heterogeneity

24- Penetration

25- Character

26- Clinical setting

27- Prevalence

28- Modifier genes

29- Case-control

30- Clinical utility



درمان^{۳۱} (چه مثبت و یا منفی) مورد بررسی قرار می‌گیرد. بنابراین در این بخش تمامی جنبه‌های استفاده از تست امکان‌سنجی می‌گردد. آیا انجام تست نتیجه مثبتی در روند درمان ایجاد خواهد نمود؟ چه مشکلاتی ممکن است بر فرد به دنبال داشته باشد؟ آیا پس از معین شدن نتیجه امکان درمانی اختصاصی مناسب فراهم می‌باشد؟ برای مثال هنوز در مورد کاربرد درمانی تست‌های فاکتور انعقادی ۲ و ۵ (Factor v Leiden & Prothrombin) در خانم‌های بارداری که مکرراً سقط جنین داشته و ناقلین جهش در ژن‌های فوق می‌باشند، قطعیتی وجود ندارد، هر چند اعتبار روش آزمایشگاهی و اعتبار بالینی تست‌های فوق قابل قبول می‌باشد. آیا امکان ارائه خدمات درمانی (در صورت موجود بودن) چه به لحاظ مکان‌های ارائه دهنده خدمت و یا در دسترس بودن داروی فرضی وجود دارد؟ آیا تبعات اجتماعی و اقتصادی انجام تست ارزیابی شده است؟

همچون متغیرهایی که در بالا بدان‌ها اشاره شد و بر روی اعتبار بالینی یک تست ژنتیکی تأثیر می‌گذارند، عواملی همچون نوع جمعیت مورد مطالعه، تست‌های مورد استفاده و امکان درمانی مناسب بر روی کاربردپذیری تست ژنتیکی مؤثر خواهد بود. برای مثال کاربردپذیری تست ژنتیکی BRCA در خانواده‌هایی که بیماری در آن‌ها از الگوی توارثی غالب تبعیت می‌کند و از تراکم بالایی نیز برخوردار می‌باشد، قابل قبول بوده چرا که پس از تشخیص جهش در فردی که یکی از اعضای نزدیک به بیمار در این خانواده می‌باشد، ارائه اقدامات پیشگیری‌کننده همچون برداشت دو طرفه سینه و تخمدان می‌تواند نتایج مهم درمانی برای فرد به دنبال داشته باشد. در حالیکه انجام این تست به عنوان یک تست غربالگری در جمعیت نرمال با فراوانی آلی پایین جهش، به هیچ عنوان کاربردپذیری بالینی قابل قبول را به

دنبال نخواهد داشت.

۱-۳-۴. مسائل اخلاقی، قانونی و اجتماعی^{۳۲}

علاوه بر نکاتی که در بالا به جهت ارزیابی تست ژنتیکی بدان اشاره شد، اثرات انجام این دست از تست‌ها در ابعاد اخلاقی، قانونی و اجتماعی نیز مورد بررسی و مطالعه قرار می‌گیرد. از جمله مهمترین نکاتی که بایستی به هنگام انجام تست‌های ژنتیکی در نظر داشت می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- نگرانی‌های که در فرد و یا وابستگان نزدیک وی که مورد بررسی قرار می‌گیرد، ایجاد می‌گردد. به خصوص زمانی که نفوذ ژن کامل نبوده و تعیین قطعی بروز بیماری در زمانی مشخص ممکن نباشد. این نگرانی زمانی بیشتر می‌گردد که هنوز درمان و یا حتی اقدام پیشگیری‌کننده موثری برای آن تعیین نشده باشد.

۲- بازتاب منفی اجتماعی که می‌تواند محدودیت‌های جدی همچون مشکلات مرتبط با سازمان‌های بیمه‌گر^{۳۳} و یا انگ‌گذاری^{۳۴} که به واسطه یک تست ژنتیکی مثبت به لحاظ وجود بیماری وی احتمال رخداد آن در آینده، برای فرد ایجاد گردد.

نتیجه‌گیری

تست‌های ژنتیک به منظور بررسی وضعیت سلامتی فرد در حال و یا آینده مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از این تست‌ها همچون شمشیر دو لبه‌ای است که از یک طرف می‌تواند در بسیاری از شرایط از جمله بیماری‌های نادر تک ژنی و سرطان‌ها مبنای اقدام درمانی قرار گیرد و از طرف دیگر می‌تواند آثار منفی همچون تشویش ذهنی، به خصوص در مواردی که درمان موثری برای بیماری و یا شرایط مورد بررسی وجود نداشته باشد و یا تست تنها وجود شرایط و یا

31- Health outcome

32- Ethical, Legal and Social implications

33- Insurance discrimination

34- Stigmatization

مورد ارزیابی قرار گرفته و در صورتیکه نتایج حاصل از این ارزیابی موید مفید بودن تست باشد در مواقع لزوم آن هم پس از مشاوره ژنتیکی و آگاه شدن از مزایا و معایب انجام تست، مورد استفاده قرار گیرد.

بیماری خاصی را در آینده پیش بینی نماید، انگ گذاری و محدود شدن ارائه خدمات اجتماعی را به دنبال داشته باشد. لذا لازم است به جهت انجام این تست ها اعتبار تست ژنتیکی که مشتمل بر اعتبار روش انجام تست، اعتبار بالینی و کاربردپذیری آن در سطح بالین می باشد،

References:

- 1- A model process for evaluating data on emerging genetic tests. In: Khoury M, Little J, Burke W (eds) *Human genome epidemiology: a scientific foundation for using genetic information to improve health and prevent disease*. Oxford University Press; 2003.
- 2- Burke W ZR. Moving beyond ACCE: an expanded framework for genetic test evaluation. A paper for the United Kingdom Genetic Testing Network. September 2007.
- 3- Burke W. Genetic tests: clinical validity and clinical utility. *Curr Protoc Hum Genet*. 2014 Apr 18-9,15,11: (81)24.
- 4- Scott D, Grosse P, 1 Lisa Kalman, PhD, 2 Muin J. Khoury, MD, PhD. Evaluation of the Validity and Utility of Genetic Testing for Rare Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. August 2010;686(115-31).
- 5- Wylie Burke MAA. Genetic risk in context: calculating the penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 2002. Aug 94(16):1185-1187.
- 6- Jodi B Segal 1 DJB, Alejandro J Necochea, Ashkan Emadi, Lipika Samal, Lisa M Wilson, Matthew T Crim, Eric B Bass. Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation: a systematic review. *JAMA*. 2009 Jun 17;301(23):2472-2485.

