

Uporaba molekularne kariotipizacije v klinični genetiki

Implementation of molecular karyotyping in clinical genetics

Luca Lovrecic, Borut Peterlin

Clinical Institute of Medical Genetics, Division of Gynaecology and Obstetrics, University Medical Centre Ljubljana, Slovenia

Korespondenca/ Correspondence:

asist. prof. Luca Lovrecic, MD, PhD, Clinical Institute of Medical Genetics, Division of Gynaecology and Obstetrics, University Medical Centre Ljubljana, Slovenia
e-mail: lucalovrecic@gmail.com

KLjučne besede:

mikromreže, komparativna genomna hibridizacija z uporabo mikromrež, aCGH, medicinska genetika

Key words:

microarrays, array-based comparative genomic hybridization, aCGH, medical genetics

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013; 82: 669–76

Prispelo: 24. okt. 2012,
Sprejeto: 7. maj 2013

Izvleček

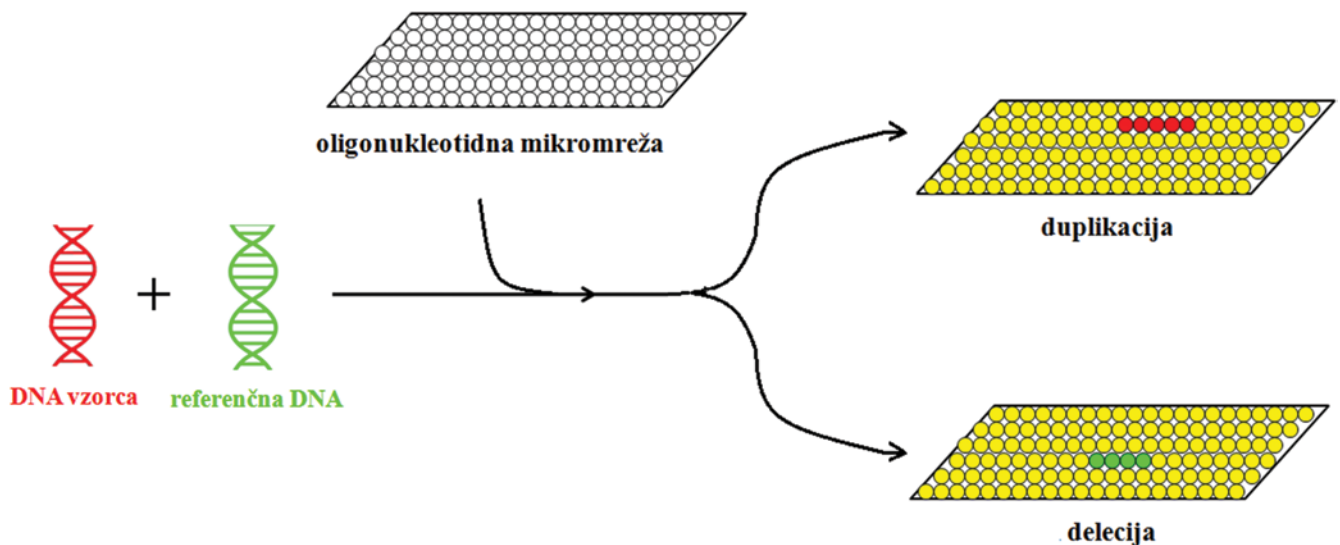
Bliskovit razvoj tehnologij za proučevanje človeškega genoma je pričakovano nadaljevanje razkritja in sekvenciranja človeškega genoma. Mikromreže, ki omogočajo izvedbo več desetisoč prej posameznih eksperimentov hkrati, prodirajo na vsa področja človeške genetike in genomike – sprva le v raziskovalne namene, v zadnjih nekaj letih vse bolj tudi v klinično diagnostične namene. Z uporabo molekularne kariotipizacije (uporabljeni termini so tudi: kromosomske mikromreže, komparativna hibridizacija z uporabo mikromrež, aCGH), lahko analiziramo mikrolelekcije/mikroduplicacije v celotnem genomu posameznika naenkrat. V primeru razvojnega zaostanka in/ali prirojenih razvojnih nepravilnosti je molekularna kariotipizacija postala test prve izbire in ne več standardno G-proganje kromosomov. Kromosomske mikromreže uporabljamo kot test izbire v skupini posameznikov z idiopatsko umsko manjrazvitostjo in/ali razvojnimi zaostankom in/ali dizmorfni znaki in/ali razvojnimi nepravilnostmi (UM/RZ/DZ/RN). Hkrati ima metoda pomembno mesto na področju prenatalne diagnostike ter se vedno pogosteje uporablja v predimplantacijski genetski diagnostiki.

Namen prispevka je seznaniti strokovno javnost z novo metodo, njeno vključenostjo v slovenskem prostoru ter opredeliti klinične primere, za katere je metoda primerna.

Abstract

Rapid development of technologies for the study of the human genome is an expected step after the discovery and sequencing of the entire human genome. Chromosomal microarrays, which allow us to perform tens of thousands of previously individual experiments simultaneously, are being utilized in all areas of human genetics and genomics. Initially, this was applicable only for research purposes, but in the last few years their clinical diagnostic purposes are becoming more and more relevant. Using molecular karyotyping (also chromosomal microarray, comparative genomic hybridization with microarray, aCGH), one can analyze microdeletions / microduplications in the whole human genome at once. It is a first-tier cytogenetic diagnostic test instead of G-banded karyotyping in patients with developmental delay and/or congenital anomalies. Molecular karyotyping is used as a diagnostic test in patients with unexplained developmental delay and/or idiopathic intellectual disability and/or dysmorphic features and/or multiple congenital anomalies (DD/ID/DF/MCA). In addition, the method is used in prenatal diagnostics and in some centres also in preimplantation genetic diagnosis.

The aim of this paper is to inform the professional community in the field about this new diagnostic method and its implementation in Slovenia, and to define the clinical situations where the method is appropriate.



Slika 1: Shematski prikaz principa molekularne kariotipizacije.

1. Uvod

Citogenetska diagnostika se je z vpeljavo novih tehnologij v zadnjih letih precej spremenila. Klasična kariotipizacija z G-proganjem je bila več kot 35 let prva izbira za odkrivanje kromosomskih preureditev. Njena glavna omejitev je ločljivost, ki je v razponu 3–10 Mb, kar pomeni, da mikrodelecij/mikroduplicacij, ki so manjše, s to metodo ne moremo identificirati. Po nekaterih ocenah so take manjše genomske spremembe (mutacije) kar 15 % vseh mutacij pri genetskih boleznih človeka.¹ Dodatne pomanjkljivosti kariotipizacije so subjektivna ocena kromosomskih delecij in duplikacij ter znatna variabilnost v stopnji detekcije med posameznimi citogenetiki in laboratoriji.

Tehnika molekularne kariotipizacije se je razvila konec devetdesetih let prejšnjega stoletja² in je postala metoda izbire pri odkrivanju kromosomskih preureditev v številnih primerih v klinični praksi. Z vedno bolj razširjeno uporabo novega genetskega testa³ molekularne kariotipizacije v medicini v zadnjih letih se povečuje odstotek pojasnjenih vzrokov za klinične težave in število novoodkritih sindromov, kot je na primer delecijski sindrom 8p23.1,⁴ mikrodelecijski sindrom 2q23.1,⁵ mikrodelecijski sindrom 15q23.1⁶ ter številni drugi. Prav tako so bili nedavno objavljeni rezultati molekularne kariotipizacije v skupinah posameznikov z epilepsijo⁷ ali motnjami avtističnega spektra,⁸ ki so pokazali, da so vzročne genomske

preureditve prisotne pri približno 1 % posameznikov iz vsake skupine. Metoda je koristna tudi na področju prenatalne diagnostike, kjer je v določenih kliničnih situacijah že metoda izbire.⁹ Molekularna kariotipizacija je pomembna metoda tudi v onkologiji, vendar se bomo v članku omejili na njeno uporabo na ožjem področju medicinske genetike.

Čeprav trenutno ne vemo, kako se zdravi-jo genetski sindromi, je postavitve diagnoze ključnega pomena tako za posameznika kot za družino iz več vidikov: 1. postavimo konkretno diagnozo in vzrok za posameznikove težave in ne le opisne diagnoze neznanega vzroka, kot na primer razvojni zaostanek; 2. preneha se iskanje vzrokov za klinične težave in s tem tudi izvajanje nepotrebnih dodatnih preiskav; 3. diagnoza omogoči posamezniku ustrežnejšo medicinsko obravnavo in dodatno pomoč – učna, razvojna, socialna; 4. specifična diagnoza omogoči genetsko svetovanje in oceno tveganja za ponovitev težav pri sorojcih ali v širši družini.

S prispevkom želimo prispevati k boljšemu informiranju zdravstvenega osebja in k učinkoviti uporabi nove metode v vsakdanjem kliničnem delu.

Prednosti metode pred klasično kariotipizacijo

- boljša ločljivost (trenutno maksimalno 6 KB);
- bolj zanesljiva interpretacija rezultatov – metoda ni občutljiva za subjektivnost analitika
- možnost avtomatizacije;
- hitrejši rezultati;
- ni potrebe po delečih se celicah;
- potrebne je manj biološkega materiala za analize.

Prednosti metode pred metodo FISH:

- analiza celotnega genoma v enem eksperimentu;
- odkrivanje duplikacij in delecij z enako občutljivostjo;

(metoda FISH je za duplikacije manj občutljiva).¹¹

2. Metoda molekularne kariotipizacije in klinični primeri

Molekularna kariotipizacija temelji na metodi primerjalne genomske hibridizacije z uporabo mikromrež (Array-based comparative genomic hybridization, aCGH). Kratka oligonukleotidna zaporedja DNA (deoksiribonukleinska kislina), ki predstavljajo točno določene segmente genoma, so imobilizirana na objektnem stekelcu, kamor hkrati hibridiziramo preiskovančev in referenčno DNA, vsako označeno s svojim barvilom (Slika 1). Spremembo števila kopij zaznamo kot razliko v intenziteti signala obeh DNA. Ločljivost metode je odvisna od števila in velikosti oligonukleotidnih zaporedij.¹⁰

Trenutno dostopne komercialne mikromreže za analizo celotnega genoma vsebujejo do 1,000,000 oligonukleotidnih zaporedij razporejenih enakomerno po celotnem genomu. Poleg standardnih mikromrež lahko uporabnik individualno oblikuje tarčno mikromrežo (targeted microarrays), kjer so na primer poleg osnovne pokritosti celotnega genoma dodatno bolj na gosto pokrite regije z znanimi mikrodelecijskimi/mikroduplicacijskimi sindromi ter regije, povezane z umsko manjrazvitostjo.

Glavna pomanjkljivost metode je nezmožnost zaznati uravnotežene strukturne kromosomske spremembe kot so translokacije in inverzije, ki so prisotne pri približno 1/500–1000 posameznikov. Slednje so lahko patološke, kadar je prelom na mestu gena ali regulacijske regije. Pojav patoloških uravnoteženih preureditev je zelo redek, zato prednosti metode aCGH, predvsem višja občutljivost metode za odkrivanje genomskih mutacij in s tem boljši diagnostični izplen, odtehta omenjeno slabost.^{11–13}

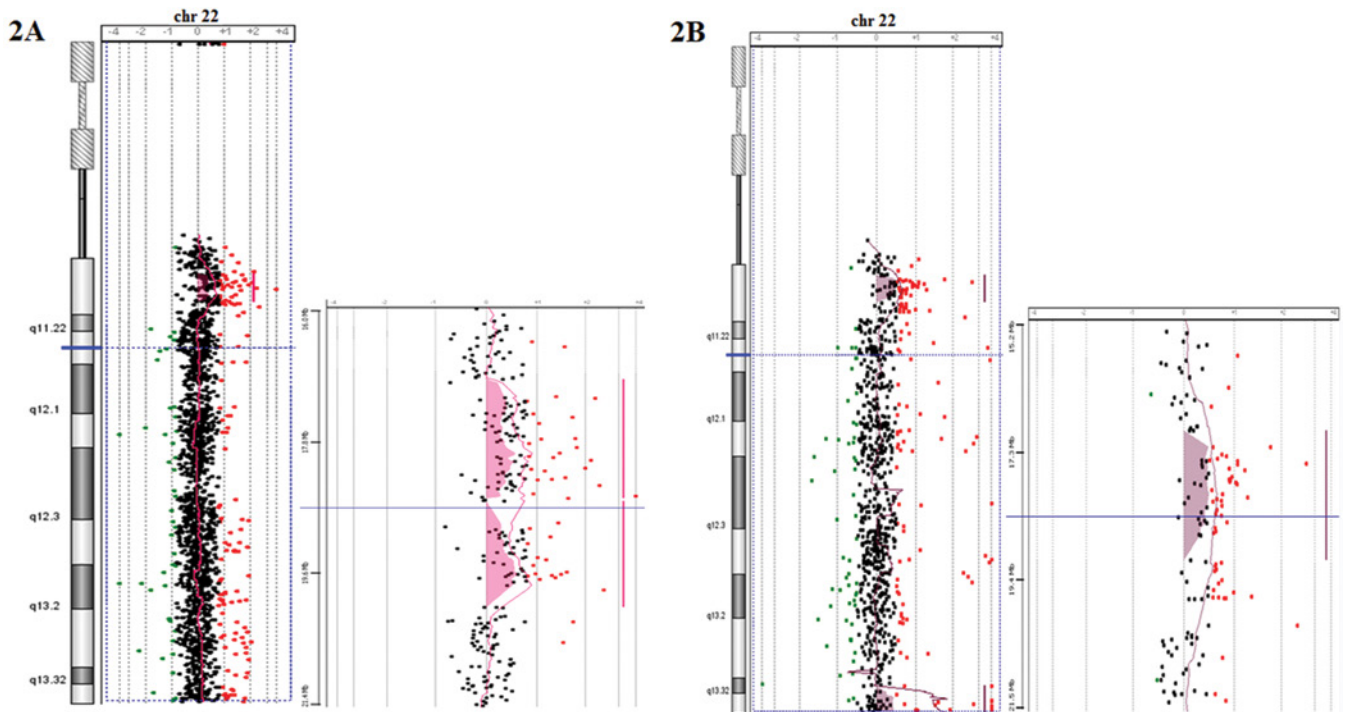
Druga pomanjkljivost metode je možnost odkrivanja variabilnega števila kopij DNA (CNV – copy number variation) nejasnega pomena. Nekatere CNV so patološke, mnoge pa benigne in so del interindividualne raznolikosti. Pri vsakem posamezniku je v povprečju okoli 30 benignih CNV.¹⁴ Slednje lahko predstavljajo izziv pri interpretiranju rezultatov analize aCGH. Ob vsaki analizi je potrebno najprej izključiti možnost, da gre za eno benignih CNV. V ta namen obstajajo baze, kjer se redno in pogosto dodajajo podatki o odkritih benignih CNV v kliničnih laboratorijih po svetu.

Rezultate analize aCGH lahko uvrstimo v eno od štirih kategorij: 1. ni klinično pomembnih preureditev; 2. odkrite klinično pomembne preureditve, ki so dokazano povezane z napotno indikacijo; 3. odkrite preureditve nejasnega pomena, prisotne pri preiskovancu in enem od staršev; 4. odkrite preureditve nejasnega pomena, prisotne samo pri preiskovancu, ne pa tudi pri starših.

Pri 3. kategoriji, ki se glede na trenutne objave pojavlja v približno 5 % analiziranih primerov,¹⁵ je pomen najdene spremembe odvisen od njene velikosti, umestitve, genske variabilnosti in heterogenosti (glej klinični primer 1). Pri 4. kategoriji je ključno iskanje informacij o odkriti spremembi za razjasnitev klinične slike, ugotovitev vpliva in funkcije genov, ki jih preureditev prizadeva, ter za postavitev diagnoze (glej Klinični primer 2).

Klinični primer 1

V ambulanti je bil pregledan deček z dismorfniimi znaki (mikrokranija, ozek bitemporalni premer, epikantus, nizko položeni uhlji, sandalski znak na stopalih) in razvoj-



Slika 2: Duplikacija na kromosomu 22, odkrita pri 2-letnem dečku z razvojnim zaostankom in prirojenimi nepravilnostmi (2A), in duplikacija pri enem izmed staršev (2B).

nimi nepravilnostmi (nefunkcionalna polistična desna ledvica, hipospadija, atrezija anusa). Klasična kariotipizacija je pokazala normalen moški kariotip, 46,XY. Opravljena je bila molekularna preiskava, ki je pokazala mikroduplicacijo kromosoma 22, arr 22q11.2(17,283,592–19,886,024)x1 (Slika 2A in 2B). Izkazalo se je, da ima eden izmed staršev enako kromosomsko spremembo.

Za mnoge sindrome je značilna raznolika klinična ekspresija. Zato so klinični znaki pri enem od staršev lahko zelo blagi in se zato opazijo šele po najdbi genomske preureditve pri potomcu, ki ima večje težave ter po naknadnem usmerjenem iskanju kliničnih težav pri enem od staršev. Taka najdba je pomembna za genetsko svetovanje, načrtovanje družine in potencialno testiranje ostalih družinskih članov, saj je v primeru, da posameznik nosi določeno preureditev, verjetnost prenosa le-te na potomce v vsaki naslednji nosečnosti 50 %.

Klinični primer 2

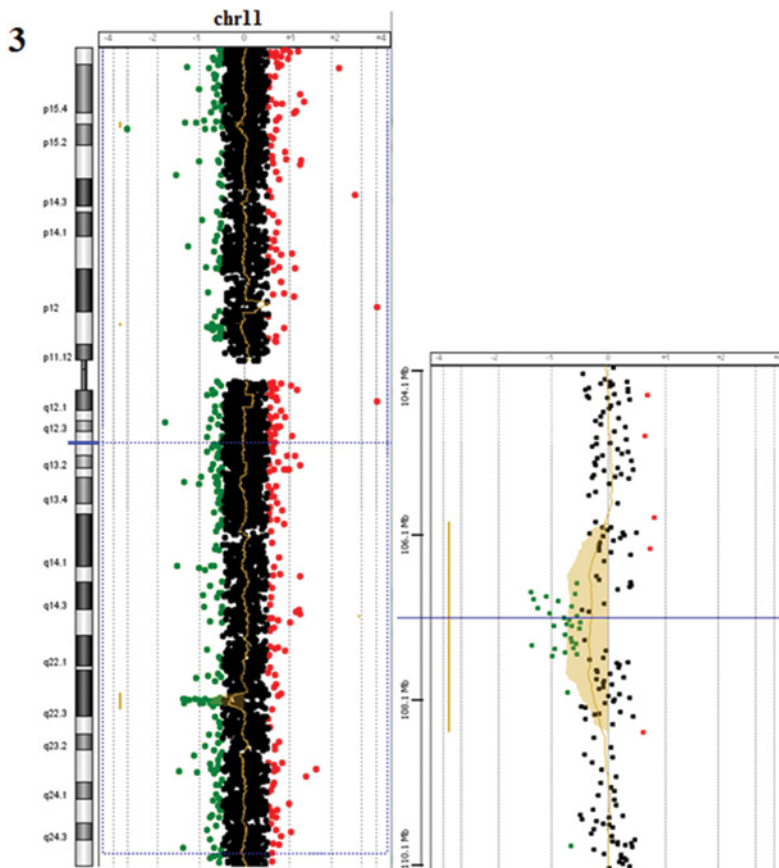
V ambulanti je bila pregledana deklica z blagim razvojnim zaostankom, dizmorfnimi znaki (dolihocfalija, ozek bitemporalni premer, hipertelorizem, izbočeno čelo, nizko položeni neizoblikovani uhlji, kratek nos, velik jezik) in razvojnimi nepravilnost-

mi (hipoplastični korpus kalozum, okvare prekatnega pretina, vezikouretralni refluks). Klasična kariotipizacija je pokazala normalen ženski kariotip, 46,XX. Opravljena je bila molekularna citogenetska preiskava, ki je pokazala *de novo* mikrolelecijo na kromosomu 11, arr 11q22.3(106,834,677–107,598,523)x1 dn (Slika 3).

V primerih, ko kromosomska preureditev nastane na novo, je ključno iskanje informacij o odkriti spremembi zato, da se razjasni klinična slika, ugotovi vpliv in funkcija genov, ki jih preureditev prizadeva, ter postavi diagnoza. Ob tem je potrebno najprej izključiti možnost, da gre za eno od benignih CNV.

3. Molekularna kariotipizacija v skupini posameznikov z nepojasnjeno umsko manjrazvitostjo in/ali razvojnim zaostankom in/ali dizmorfnimi znaki in/ali prirojenimi razvojnimi nepravilnostmi

Laboratorijska medicinska diagnostika posameznikov z idiopatsko umsko manjra-



Slika 3: Mikrodelecija kromosoma 11, odkrita na novo pri 3-letni deklici z umsko manjrazvitostjo in dizmorfni znaki. Delecije pri starših nismo potrdili.

zvitostjo in/ali razvojnimi zaostankom in/ali dizmorfni znaki in/ali prirojenimi razvojnimi nepravilnostmi (UM/RZ/DZ/RN) se je z vpeljavo nove metodologije mikromrež v zadnjih letih precej spremenila. Do nedavne je bila metoda izbire klasična kariotipizacija z G-proganjem in ob normalnem kariotipu še analiza subtelnih regij z metodo FISH (fluorescentna hibridizacija *in-situ*, *angl.* fluorescence in situ hybridization) ali MLPA (*angl.* multiplex ligation-dependent probe amplification).

Molekularna kariotipizacija je postala metoda izbire za odkrivanje genomske mutacije pri posameznikih z UM/RZ/DZ/RN.^{11,12,16-18} V skupini več kot 21.000 bolnikov z razvojnimi zaostankom/umsko manjrazvitostjo ali z multiplimi razvojnimi nepravilnostmi ali motnjo avtističnega spektra je bila z molekularno kariotipizacijo pri 15–20 % vseh analiziranih primerov odkrita neuravnotežena patogene genomske spremembe, za razliko od standardne kariotipizacije, pri kateri je ta odsotek le 2–3 %, če izvzamemo prepoznavne kromosomske nepravilnosti, kot npr. Downov sindrom.^{13,16}

Poleg klinične diagnostične uporabnosti omogoča molekularna kariotipizacija odkrivanje novih mikrodelecijskih/mikroduplicacijskih sindromov ter odkrivanje novih genov, odgovornih za že opisane klinične sindrome. Omejitev molekularne kariotipizacije je, da ni mogoče zaznati uravnoteženih strukturnih kromosomskih preureditev in nizkostopenjskega mozaicizma, vendar je v skupini bolnikov z UM/RZ/DZ/RN ali motnjo avtističnega spektra takih kromosomskih preureditev izredno malo, manj kot 1 %. Retrospektivno zbrani podatki o vseh napotitvah na citogenetske preiskave zaradi razvojnega zaostanka in/ali umske manjrazvitosti v obdobju 1996–2005 so na vzorcu več kot 36.000 bolnikov pokazali, da bi v primeru uporabe molekularne kariotipizacije ostalo neodkritih 0,78 % primerov vseh napotitev.¹⁸

4. Molekularna kariotipizacija v prenatalni diagnostiki

V prenatalni diagnostiki so klasično G-proganje kromosomov, fluorescentna hibridizacija *in situ* (FISH) in kvantitativna fluorescentna reakcija s polimerazo (QF-PCR) še vedno metode izbire za odkrivanje kromosomskih mutacij. Ločljivost klasične kariotipizacije z G-proganjem na celicah, pridobljenih prenatalno, je slabša kot pri kariotipizaciji limfocitov, zaradi česar je še težje prepoznati manjše kromosomske preureditve. Dejstvo je, da številnih pogostejših mikrodelecijskih ali mikroduplicacijskih sindromov z rutinsko kariotipizacijo ne moremo zaznati. Njihove fenotipske značilnosti lahko izkušenega klinika usmerijo v specifično diagnostiko FISH,¹⁹ vendar večinoma šele v obdobju po rojstvu.²⁰

Molekularna kariotipizacija je na mestu kot dodatna diagnostična metoda (ob klasični kariotipizaciji) v kliničnih primerih, opisanih v nadaljevanju.⁹

Prvič, kadar so prisotne večje ultrazvočne razvojne nepravilnosti ploda, kot so povišana nuhalna svetlina ali prisotnost več mehkih ultrazvočnih označevalcev za kromosomske napake ali intrauterini zastoj rasti ali spremembe količine plodovnice, v kombinaciji z velikimi strukturnimi razvoj-

nimi nepravilnostmi, kot so srčne napake, preponske kile in nepravilnosti osrednjega živčnega sistema. Molekularna kariotipizacija v manjši skupini plodov z ultrazvočno odkritimi razvojnimi nepravilnostmi in normalnim kariotipom je pokazala, da je v kar 16 % primerov prisotna vzročna sprememba, ki jo trenutno lahko odkrijemo le z uporabo aCGH.²¹ Nedavno objavljena študija, ki je vključevala več kot 5000 prenatalnih vzorcev, je pokazala, da je pri plodovih z ultrazvočno ugotovljenimi nepravilnostmi prisotna vzročna genomska mutacija v 6,5 % ter da kar 71 % odkritih genomskih mutacij klasična kariotipizacija ne bi zaznala.²²

Drugič, kadar s klasično kariotipizacijo z G-proganjem odkrijemo na novo nastalo uravnoteženo strukturno kromosomsko preureditev pri plodu (na primer recipročno translokacijo) ali, da se na novo pojavi kromosomski označevalec. V skupini preiskovancev z razvojnimi nepravilnostmi in po klasičnem G-proganju ugotovljeno navidez uravnoteženo translokacijo, so majhne kromosomske preureditve prisotne pri 40 % primerov.^{23,24}

To kaže na pomembno vlogo metode v prenatalni diagnostiki, vendar jo je potrebno previdno vpeljati. Diagnostični izziv so namreč genomske preureditve nejasnega pomena. Če preureditev odkrijemo tudi pri enem od (zdravih) staršev, lahko sklepamo, da gre za benigno CNV. Analize staršev bi bile potrebne v približno 20 % vseh prenatalnih primerov.⁹ Študija, ki je vključevala 300 prenatalnih vzorcev, je pokazala, da v samo 1 % primerov ostane pomen odkritih preureditev nejasen.²⁵

5. Molekularna kariotipizacija v predimplantacijski diagnostiki

Predimplantacijska genetska diagnostika je del postopka oploditve z biomedicinsko pomočjo pri parih, pri katerih gre za visoko tveganje za prenos dedne/kromosomske/genetske okvare na potomce. V klinični praksi se uporablja že 20 let.²⁶ Najpogosteje se v stadiju 8-celičnega zarodka od vzameta 1 ali 2 celici za genetsko diagnostiko, kar omogoča izbor zdravih zarodkov za prenos v mater-

nico. Genetsko diagnostiko lahko izvedemo tudi na polarnih telesih ali blastocisti.

Večina PGD postopkov (76 %) se v Evropi in v Sloveniji izvaja v povezavi s strukturnimi in številčnimi kromosomskimi nepravilnostmi,²² diagnostična informacija pa je s pristopom FISH omejena na tarčno kromosomsko preureditev oziroma na številčne nepravilnosti dodatnih 3–7 kromosomov. Molekularna kariotipizacija lahko ponudi informacijo o številčnih nepravilnostih vseh kromosomov, izboljšave metode pa tudi odkrivanje mikrodelecij/mikrodublikacij.

Zadnjih nekaj let se molekularna kariotipizacija vpeljuje tudi na področju PGD in postaja metoda izbire.^{27–31}

Molekularna kariotipizacija je metoda izbire:

- v primeru posameznika z idiopatsko umsko manjrazvitostjo in/ali razvojnimi zaostankom in/ali dizmorfnimi znaki in/ali prirojenimi razvojnimi nepravilnostmi;
- pri prenatalni diagnostiki, kadar so prisotne večje ultrazvočne nepravilnosti (povišana nuhalna svetlina ali prisotnost več mehkih označevalcev za kromosomske napake ali zastoj rasti v maternici ali spremembe količine plodovnice), v kombinaciji z velikimi strukturnimi nepravilnostmi (srčne napake, preponska kila, nepravilnosti ČŽS);
- pri prenatalni diagnostiki, kadar s klasično kariotipizacijo z G-proganjem odkrijemo na novo nastalo uravnoteženo recipročno translokacijo pri plodu ali na novo pojav kromosoma označevalca;
- v nekaterih primerih v postopku predimplantacijske genetske diagnostike.

6. Genetsko svetovanje

Genetsko svetovanje je pri izboru molekularne kariotipizacije še posebej pomembno, tako v fazi pred testom kot tudi po izvedbi testa, predvsem zaradi možnosti odkrivanja genomskih preureditev neznanega pomena, ter tudi zaradi možnosti odkrivanja številnih različnih sindromov naenkrat, zaradi različne specifičnosti in občutljivosti za različne sindrome in zaradi raznolike občutljivosti/ločljivosti testnih mikromrež, ki se uporabljajo v kliničnih laboratorijih. Pred testom je potrebno pridobiti podpis informirane privolitve preiskovanca oziroma njegovega skrbnika.

Genetsko svetovanje pred izvedbo testa seznanja posameznika z namenom testa, s prednostmi metode in njenimi omejitvami v primerjavi s klasično kariotipizacijo, z osnovami metodologije in predvsem z možnimi kategorijami rezultatov. Poleg normalnega rezultata ali odkritja genomske mutacije, povezane s kliničnimi težavami preiskovanca, je potrebno pojasniti možnost, da se odkrijejo genomske spremembe neznanega pomena ter kdaj ima pomen testirati starše preiskovanca v takem primeru.

Genetsko svetovanje po izvedbi testa je odvisno od rezultata. V primeru pozitivnega rezultata je svetovanje podobno kot v ostalih primerih genetskih bolezni. Pojasni se povezava med genotipom in fenotipom, pričakovane klinične težave, morebitne druge potrebne preiskave, možnost dedovanja in smiselnost testiranja sorodnikov. V primeru negativnega rezultata je potrebno po-

novno razložiti omejitve metode ter razmisliti o dodatnih specifičnih genetskih testih ali morda o molekularni kariotipizaciji višje ločljivosti v procesu razvoja metode.

Genetsko svetovanje ob prenatalni diagnostiki ima v smislu odkrivanja sprememb neznanega pomena še posebej pomembno vlogo. Bodoči starši morajo biti seznanjeni s to možnostjo ter sprejeti teže odločitve o nadaljevanju nosečnosti v teh primerih.

7. Zaključek

Metoda molekularne kariotipizacije je sestavni del klinične genetike, tako po rojstvu kot tudi pred rojstvom. Je metoda izbire v številnih kliničnih situacijah. S pričujočim prispevkom smo želeli seznaniti strokovno javnost z novo metodo ter tako skrajšati prenos metode iz teorije v praktično uporabo tudi v slovenskem prostoru.

Literatura

1. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Human molecular genetics*. 2005; 14 Spec No. 2:R215–23.
2. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 20: 399–407.
3. Rudolf G, Peterlin B. Uporaba DNK genetskega testa v medicini. *Zdrav Vestn* 2009; 78: 65–71.
4. Ballarati L, Cereda A, Caselli R, Selicorni A, Recalcatti MP, Maitz S, et al. Genotype-phenotype correlations in a new case of 8p23.1 deletion and review of the literature. *European journal of medical genetics*. 2011; 54: 55–9.
5. Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, et al. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *American journal of medical genetics*. 2012; 158A: 861–8.
6. IS LN, Chin WH, EC PL, Tan EC. An additional case of the recurrent 15q24.1 microdeletion syndrome and review of the literature. *Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies*. 2011; 14: 333–9.
7. Mulley JC, Mefford HC. Epilepsy and the new cytogenetics. *Epilepsia*. 2011; 52: 423–32.
8. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug discovery today*. 2008; 13: 760–70.
9. Zuffardi O, Vetro A, Brady P, Vermeesch J. Array technology in prenatal diagnosis. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2011; 16: 94–8.
10. Albertson DG, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human molecular genetics*. 2003; 12 Spec No 2:R145–52.
11. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current opinion in genetics & development*. 2007; 17: 182–92.
12. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *Journal of medical genetics*. 2004; 41: 241–8.
13. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med*. 2009; 11: 139–46.
14. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006; 444: 444–54.
15. Darilek S, Ward P, Pursley A, Plunkett K, Furman P, Magoulas P, et al. Pre- and postnatal genetic testing by array-comparative genomic hybridization: genetic counseling perspectives. *Genet Med*. 2008; 10: 13–8.
16. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics*. 2010; 86: 749–64.

17. Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *Journal of medical genetics*. 2005; 42: 699–705.
18. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *European journal of medical genetics*. 2009; 52: 161–9.
19. Veltman JA, de Vries BB. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *J Mol Diagn*. 2006; 8(5): 534–7; discussion 7–9.
20. Evans MI, Henry GP, Miller WA, Bui TH, Snidjers RJ, Wapner RJ, et al. International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1999; 14: 1213–6.
21. Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Smits AP, et al. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *Journal of medical genetics*. 47: 586–94.
22. Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenatal diagnosis*. 2012; 32: 967–85.
23. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, et al. Cryptic deletions are a common finding in „balanced“ reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *Journal of medical genetics*. 2007; 44: 750–62.
24. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *European journal of medical genetics*. 2009; 52: 291–6.
25. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, et al. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenatal diagnosis*. 2009; 29: 29–39.
26. Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reproductive biomedicine online*. 2010; 21: 280–2.
27. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertility and sterility*. 2010; 94: 1173–7.
28. Hellani A, Abu-Amero K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *Reproductive biomedicine online*. 2008; 17: 41–7.
29. Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and sterility*. 2011; 95: 953–8.
30. Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertility and sterility*. 2010; 93: 1006 e7- e10..
31. Sills ES, Yang Z, Walsh DJ, Salem SA. Comprehensive genetic assessment of the human embryo: can empiric application of microarray comparative genomic hybridization reduce multiple gestation rate by single fresh blastocyst transfer? *Archives of gynecology and obstetrics*. 2012; 286: 755–61.