

# Molekularna kariotipizacija – nov pristup u kliničkoj i laboratorijskoj genetici

## Molecular karyotyping – a new approach in clinical and laboratory genetics

Luca Lovrečić\*, Irena Vrečar, Borut Peterlin

**Sažetak.** Metoda molekularne kariotipizacije omogućava analizu genomskih mutacija s visokom rezolucijom na razini cijelog humanog genoma. Manje genomske mutacije (mikrodelecije, mikroduplicacije) koje nije moguće otkriti klasičnom kariotipizacijom prisutne su u čak 15 % pacijenata s mogućom dijagnozom genetičkog poremećaja. Molekularna kariotipizacija je u određenim kliničkim slučajevima već u potpunosti zamijenila klasičnu kariotipizaciju i primjenjuje se u prenatalnoj i postnatalnoj genetičkoj dijagnostici.

**Ključne riječi:** komparativna genomska hibridizacija s mikromrežama; mikrodelecija; prenatalna genetska dijagnostika; zaostajanje u razvoju

**Abstract.** Molecular karyotyping enables the analysis of the entire human genome on high resolution scale. Smaller genomic mutations (microdeletions, microduplications) that are not detectable using conventional G-banded karyotyping, are present in about 15 % of patients with suspected genetic disease. In certain clinical settings molecular karyotyping has already replaced classical karyotype analysis and is used in postnatal as well as in prenatal genetic diagnosis.

**Key words:** array based comparative genomic hybridization; developmental delay; microdeletions; prenatal genetic diagnosis

Klinički institut za medicinsku genetiku,  
Klinika za ginekologiju i porodništvo,  
Univerzitetni medicinski centar Ljubljana,  
Ljubljana, Slovenija

Primljeno: 4. 2. 2014.  
Prihvaćeno: 20. 2. 2014.

**\*Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Luca Lovrečić, dr. med.  
Klinički institut za medicinsku genetiku,  
Klinika za ginekologiju i porodništvo,  
Univerzitetni medicinski centar Ljubljana  
Slajmerjeva 3, 1 000 Ljubljana, Slovenija  
*e-mail:* [lucalovrecic@gmail.com](mailto:lucalovrecic@gmail.com)

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD – RAZVOJ I METODA

Metoda molekularne kariotipizacije omogućava analizu cijelog genoma pacijenta odjednom s visokom rezolucijom i tako sve češće zamjenjuje klasičnu kariotipizaciju. Otkrivanje kromosomskih preuređenja, tijekom više od 35 godina temeljilo se na metodama klasične citogenetike i G-oprugavanja kromosoma. Glavno ograničenje klasične citogenetske metode je rezolucija, koja i u najboljim laboratorijima nije veća od 3 do 5

Molekularna kariotipizacija primjenjuje se u svim područjima kliničke genetike, uključujući postnatalne slučajeve, prenatalnu genetičku dijagnostiku te sve češće preimplantacijsku genetičku dijagnostiku. Postala je glavna dijagnostička metoda pomoću koje se otkrivaju genomske mutacije u pacijenata s idiopatskom mentalnom retardacijom, zaostajanjem u razvoju, dismorfnim znakovima i prirođenim razvojnim anomalijama.

megabaza (Mb), a najčešće iznosi između 5 i 10 Mb, čime je onemogućeno otkrivanje manjih mikrodelecija/mikroduplicacija. S druge strane, takve manje mikrodelecije i mikroduplicacije uzrok su kliničkih poremećaja u otprilike 15 % pacijenata sa sumnjom na gensku ili kromosomsku aberaciju<sup>1</sup>. Dodatna ograničenja kariotipizacije su subjektivna procjena kromosomskih preuređenja i značajna varijabilnost u sposobnosti njihova otkrivanja između različitih laboratorija. Metoda komparativne genomske hibridizacije na kromosomima razvijena je s ciljem povećanja rezolucije i uspješno se koristila za analizu kromosomskih preraspodjela u solidnim tumorima već od 1992. godine<sup>2</sup>. Metoda se temelji na fluorescentnom označavanju ispitivanog i referentnog DNK-a označenog različitim bojama, koje se potom istovremeno hibridizira na unaprijed pripremljene normalne kromosomske preparate. Razlike u hibridizaciji ispitivanog i referentnog DNK-a uočavaju se kao razlike intenziteta boja, što je osnova za procjenu prisutnosti kromosomskih preuređenja. Kako bi se dodatno povećala rezolucija, krajem devedesetih godina razvila se komparativna genomska hibridizacija s upotrebom mikromreža ili molekularna karioti-

pizacija (engl. *array-based comparative genomic hybridization*; aCGH). Iako su prvotno korišteni BAC klonovi (engl. *bacterial artificial chromosome*)<sup>3</sup>, kasnije su ih zamijenile mikromreže s oligonukleotidima, koje se sastoje od umjetno sintetiziranih kratkih specifičnih sljedova nukleotida, koji su jedinstvenog redoslijeda u genomu i predstavljaju specifičan odsječak humanog genoma. Time rezolucija mikromreže ovisi samo o tome koliko su blizu smješteni ti odabrani kratki jedinstveni sljedovi kroz cijeli genom. Trenutno dostupne komercijalne mikromreže nude rezoluciju od 1000 – 2000 bp.

S obzirom na sve veću upotrebu metode tijekom posljednjih godina, raste i broj razjašnjenih slučajeva zaostajanja u razvoju i prirođenih razvojnih anomalija, a otkrivaju se i novi sindromi, poput nedavno opisanih 5q31.3<sup>4</sup> i 13q12.3 mikrodelecijskih sindroma<sup>5</sup>.

## PREDNOSTI I OGRANIČENJA METODE

Metoda molekularne kariotipizacije, aCGH, u usporedbi s klasičnom kariotipizacijom ima bolju rezoluciju, daje veću sigurnost pri interpretaciji rezultata (subjektivnost očitavanja nije moguća), omogućava kraće vrijeme do rezultata, ne zahtijeva da su stanice u fazi diobe, koristi manje osnovnog radnog materijala i omogućava automatizaciju cijelog postupka. U usporedbi s FISH metodom (engl. *fluorescence in situ hybridization*), prednosti aCGH metode su mogućnost analize cijelog genoma odjednom i sposobnost otkrivanja duplikacija s većom osjetljivošću<sup>6</sup>.

Glavno ograničenje metode je nemogućnost otkrivanja balansiranih kromosomskih preuređenja (translokacije i inverzije), koja mogu biti patološka ako se lom dogodio na mjestu gena ili regulatorne regije, te koja mogu biti problematična pri segregaciji kromosoma tijekom stvaranja jajnih stanica i spermija, često uzrokujući spontane pobačaje.

Drugo ograničenje metode aCGH je mogućnost otkrivanja varijacija broja kopija (engl. *copy number variation*; CNV) nepoznatog značenja (engl. *variant of unknown significance*; VUS). Takvi nalazi su izazov prilikom interpretacije rezultata. Naime, većina otkrivenih CNV-ova su benigne varijacije i prisutne su u normalnoj populaciji, dok su

neke patološke. Prilikom interpretacije rezultata važan korak čini pregled svih postojećih baza podataka, u kojima se redovito skupljaju novi primjeri, kao što su DECIPHER<sup>7</sup>, ECARUCA<sup>8</sup>, ICGG<sup>9</sup> i DGV<sup>10</sup>.

#### EPIDEMIOLOGIJA GENOMSKIH MUTACIJA

Primjenom nove metode aCGH genomske mutacije (delecije i duplikacije) postale su potpuno novo područje kliničke genetike. Genomske mutacije čine prijelaz između genskih i kromosomskih mutacija. Tek je uvođenjem metode aCGH postalo jasno kolika je učestalost genomske mutacije te kakav udio čine patološke, benigne i mutacije s nejasnim značenjem. U jednom istraživanju analizom 1.000 genoma otkriveno je više od 14.000 većih delecija<sup>11</sup>, dok je, usporedivo, druga skupina istraživača otkrila više od 11.000 strukturnih varijacija analizom 800 genoma<sup>12</sup>, čime je pokazano da su to česta genomska preuređenja.

#### PRIMJENA MOLEKULARNE KARIOTIPIZACIJE U KLINIČKOJ PRAKSI

Molekularna kariotipizacija primjenjuje se u svim područjima kliničke genetike, uključujući postnatalne slučajeve, prenatalnu genetičku dijagnostiku, te sve češće preimplantacijsku genetičku dijagnostiku. Metoda u navedenim područjima već uspješno nadopunjuje klasičnu kariotipizaciju, a sve više i potpuno zamjenjuje te metode.

##### Postnatalna dijagnostika

Molekularna kariotipizacija je glavna dijagnostička metoda pomoću koje se otkrivaju genomske mutacije u pacijenata s idiopatskom mentalnom retardacijom, zaostajanjem u razvoju, dismorfimim znakovima i prirođenim razvojnim anomalijama<sup>6,13-15</sup>. Odnedavno su značajne indikacije i određeni tipovi epilepsije i stanja spektra autističkih poremećaja<sup>16,17</sup>. U jednom istraživanju je pomoću metode molekularne kariotipizacija analizirana velika skupina od 21.000 pacijenata sa zaostajanjem u razvoju, mentalnom retardacijom, prirođenim razvojnim anomalijama i poremećajima autističnog spektra. U tom je istraživanju utvrđena uzročna genomska mutacija (mikrodelecija ili mikroduplikacija) u 15 – 20 % slučajeva<sup>14,18</sup>. Za usporedbu, klasičnom kariotipizacijom

uspješno bi bila otkrivena kromosomopatija u svega 2 do 3 % pacijenata. Prepoznatljivi kromosomski poremećaji, kao što je Down sindrom, bili su isključeni iz ovog istraživanja. Nadalje, u drugom istraživanju je provedena retrospektivna analiza nalaza svih pacijenata upućenih na citogenetičku dijagnostiku u razdoblju od 1996. do 2005. godine, njih više od 36.000. Utvrđeno je da upotrebom molekularne kariotipizacije ne bi bilo moguće otkriti kromosomska preuređenja u svega 0,78 % svih upućenih pacijenata<sup>15</sup>.

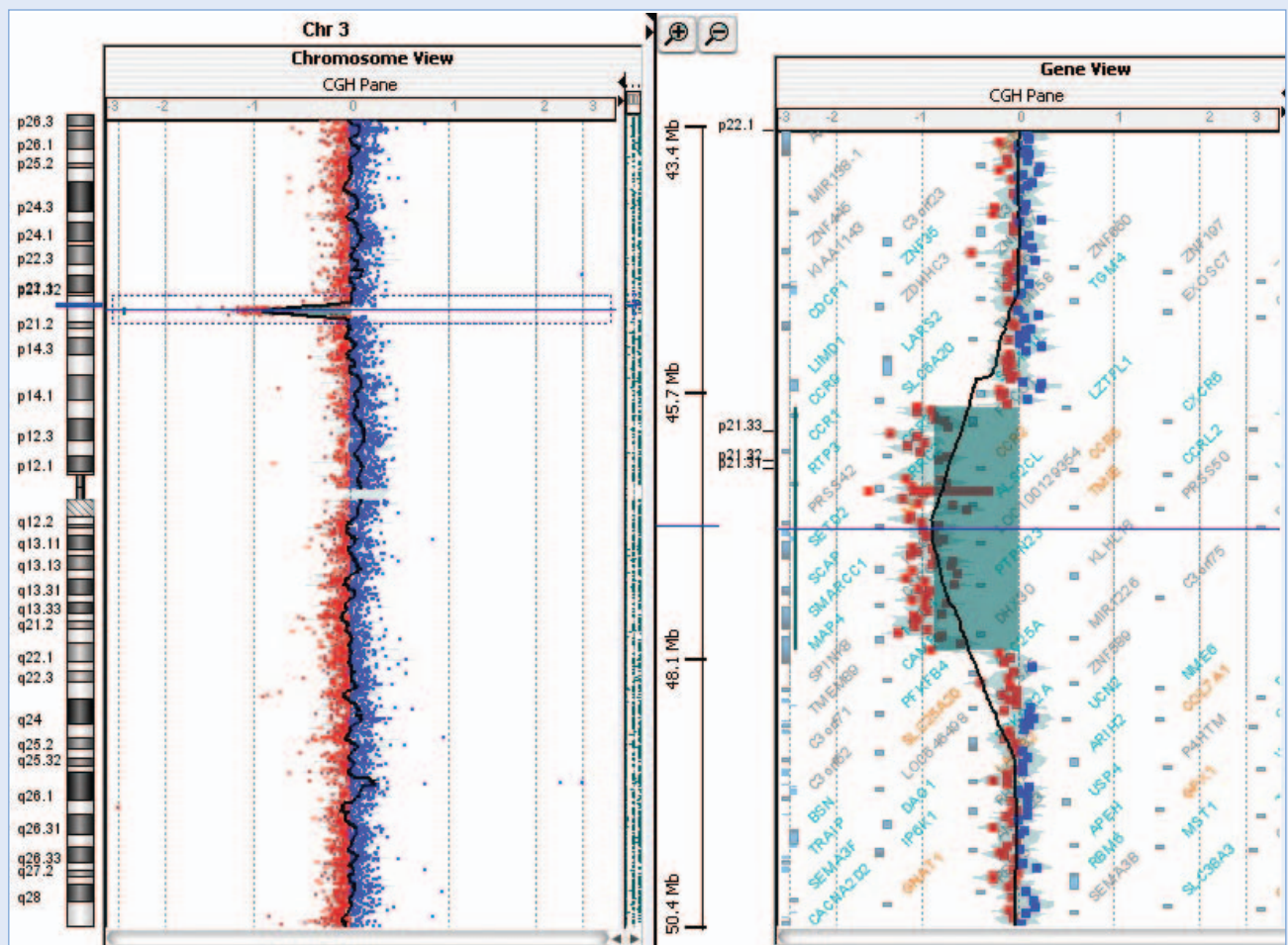
Osim što je rezultat neusporedivo bolji, molekularnom kariotipizacijom moguće je otkriti i nove, nepoznate mikrodelecijske i mikroduplikacijske sindrome, kao i nove gene uključene u patogenezu prethodno opisanih kliničkih sindroma.

##### Klinički slučaj 1

U ambulanti Kliničkog instituta za medicinsku genetiku (UKC Ljubljana) pregledan je šestogodišnji dječak s općim zaostajanjem u razvoju, dismorfimim znakovima lica (izduženo lice, koso položeni očni rasporci usmjereni prema dolje, udubljeni filtrum, nisko postavljene uši neobičnog oblika), hipotonijom, displastičnim desnim bubregom, pijeloureteralnom stenozom, hidronefrozom i hipotireozom. Obiteljska anamneza bila je uredna. Nalaz klasične kariotipizacije i subtelomernog FISH-a bili su uredni. Molekularnom kariotipizacijom utvrđena je mikrodelecija područja 3p21.31 (arr[hg19] 3p21.31(45,881,062-48,009,576)x1 dn), veličine 2,13Mb ± 0,01 Mb (slika 1). U tom području nalazi se više od 30 poznatih gena indeksiranih u bazi podataka RefSeq. Zasad nema opisa istog slučaja u literaturi, a pregledom svih baza utvrdili smo da su dosad opisana samo dva slična slučaja. Opisana mikrodelecija najvjerojatnije je uzrok kliničke slike u dječaka, te čini novu spoznaju u razumijevanju genetičke etiologije kliničke slike u tog djeteta.

##### Prenatalna genetička dijagnostika

U prenatalnoj genetičkoj dijagnostici metode klasične kariotipizacije, FISH i kvantitativna fluorescentna lančana reakcija polimerazom (QF-PCR) trenutno su metode izbora za otkrivanje kromosomopatija. Molekularna kariotipizacija svakako je indicirana u slučajevima ultrazvučno utvrđenih struk-



Slika 1. Delecija 3p21.31 otkrivena molekularnom kariotipizacijom.

Slika prikazuje rezultat aCGH. Lijevo je prikazan cijeli kromosom 3. Crna crta prikazuje prosječne vrijednosti razlike intenziteta među ispitivanim i referentnim DNK-om i crta se nalazi vertikalno u jednoj liniji. U odsjeku 3p21.31 prosjek vrijednosti se značajno pomakne ulijevo, što predstavlja deleciju. Desna slika prikazuje samo dio kromosoma 3, gdje je prisutna delecija. Crvene i plave točke predstavljaju razlike u intenzitetu među ispitivanim i referentnim DNK-om za svaki oligonukleotid posebno.

Interpretacija rezultata molekularne kariotipizacije predstavlja izazov, pogotovo u slučajevima otkrivanja VUS-a i genomske mutacije koje prethodno nisu bile opisane, kao i u slučajevima kada su genomske mutacije prisutne u pacijenta i jednog od roditelja (pojam varijabilne penetrabilnosti). Zbog mogućnosti pronalaza VUS-a posebno je važno provesti genetičko savjetovanje prije i poslije testa.

turnih anomalija ploda, uključujući poremećaje u razvoju srca, dijafragmalnu herniju, poremećaje u razvoju središnjeg živčanog sustava, te posebice kad je zahvaćeno više organskih sustava<sup>19</sup>. Analizom više od 5.000 prenatalnih uzoraka pokazano je da je u skupini plodova s ultrazvučno utvrđenim

anomalijama moguće otkriti uzročnu genomske mutaciju u 6,5 % slučajeva, od kojih se većina, čak 71 %, ne bi mogla utvrditi klasičnom kariotipizacijom<sup>20</sup>. U prenatalnoj dijagnostici je molekularnom kariotipizacijom potrebno pratiti još jednu skupinu pacijenata, koja uključuje osobe kojima je klasičnom kariotipizacijom otkrivena balansirana translokacija *de novo* ili marker kromosom *de novo*<sup>19</sup>. Prema podacima objavljenih istraživanja u skupini pacijenata s prirođenim razvojnim anomalijama u kojih je klasična kariotipizacija otkrila balansiranu translokaciju, čak u 40 % slučajeva otkrivena su manja kromosomska preuređenja<sup>21,22</sup>.

Svakako je jasno da je i u prenatalnoj genetičkoj dijagnostici rezultat metode molekularne kariotipizacije neusporedivo bolji, no potrebno je naglasiti značajan izazov. Naime, metoda često otkrije

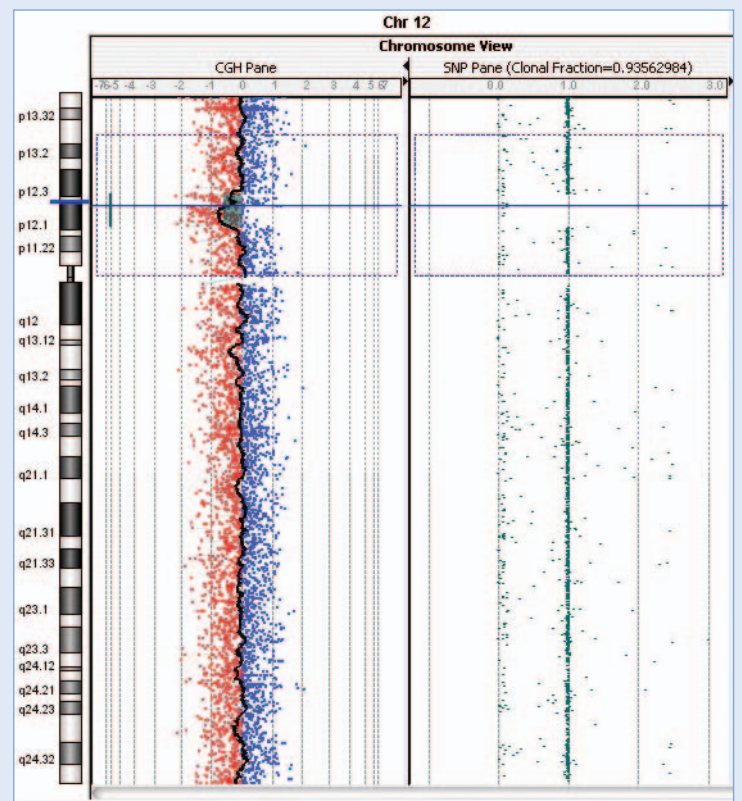
genomske VUS promjene (engl. *variant of unknown significance*). U takvim slučajevima testiraju se i roditelji kako bi se utvrdilo je li VUS koji je otkriven u ploda prisutan u jednog od roditelja. U slučaju kada je roditelj nositelj iste genomske varijacije i kada nema nikakvih kliničkih simptoma može se zaključiti da je utvrđena genomska promjena najvjerojatnije benignog značenja. Analiza roditelja potrebna je u približno 20 % slučajeva<sup>19</sup>. Istraživanje provedeno na više od 300 prenatalnih slučajeva pokazalo je da je nakon analize roditelja ostalo približno 1 % nerazjašnjenih slučajeva<sup>23</sup>.

#### Klinički slučaj 2

Radi povećanog nualnog nabora bila je napravljena amniocenteza i kariotipizacija koja je pokazala naizgled balansiranu kompleksnu translokaciju u ploda: 46,XY,t(7;8;12)(q34;q21.1;q12)dn. Metodom aCGH otkrivena je intersticijska delecija područja 12p11.2 ((arr[hg19] 12p12.1(21,356,582-25,062,714)x1 dn), veličine  $3,70 \pm 0,01$  Mb (slika 2). U tom području nalazi se trenutno 13 poznatih gena. U literaturi je dosad opisano nekoliko slučajeva s delecijama koje su uključivale i opisanu regiju. U tim slučajevima bilo je prisutno zaostajanje u razvoju, dismorfni znakovi i strukturne anomalije srca<sup>24</sup>. Ultrazvuk srca u našem primjeru bio je urednog nalaza.

Klinički slučaj 2 jasno prikazuje kako je kod kompleksnih translokacija moguća uključenost i drugih područja genoma, a ne samo točaka loma, što je od uvođenja aCGH metode opisano i u nekoliko znanstvenih publikacija<sup>25</sup>.

Osim u klasičnoj prenatalnoj dijagnostici, primjena aCGH metode moguća je i u preimplantacijskoj genetičkoj dijagnostici (PGD)<sup>26</sup>. Preimplantacijska genetička dijagnostika primjenjuje se u parova s visokim rizikom za prijenos kromosomske ili genske mutacije na zametak i uključuje postupak umjetne oplodnje. Indikaciju u više od tri četvrtine (76 %) PGD postupaka u Europi i Sloveniji čine strukturna i brojana kromosomska preuređenja<sup>27</sup>, za koje je FISH glavna metoda dijagnosticiranja. No, metoda FISH omogućava analizu samo ciljanih kromosomskih preuređenja, te eventualno analizu diploidnosti za tri do sedam kromosoma. S druge strane, metoda aCGH omogućava analizu aneuploidija svih kro-



**Slika 2.** Delecija 12p11.2 otkrivena molekularnom kariotipizacijom.

Slika prikazuje rezultat aCGH. Lijevo je prikazan cijeli kromosom 12. Crna crta prikazuje prosječne vrijednosti razlike intenziteta među ispitivanim i referentnim DNK-om i crta se nalazi vertikalno u jednoj liniji. U odsjeku 12p11.2 prosjek vrijednosti se značajno pomakne ulijevo, što predstavlja deleciju. Desna slika prikazuje i rezultate SNP-a (engl. *single nucleotide polymorphisms*), gdje se vidi da u odsjeku delecije nema heterozigotnosti (u vertikalnoj liniji u sredini, u regiji delecije nema signala).

mosoma odjednom, a s napretkom tehnologije i otkrivanje mikrodelecija i mikroduplikacija. Posljednjih godina najčešće se primjenjuje biopsija blastociste, nakon čega slijedi probir za aneuploidije pomoću metode aCGH, što omogućava odabir zametaka bez mutacije za prijenos u maternicu, što dokazano poboljšava postotak uspješno iznesenih trudnoća<sup>28</sup>.

#### INTERPRETACIJA REZULTATA I GENETIČKO SAVJETOVANJE

Interpretacija rezultata molekularne kariotipizacije predstavlja izazov, pogotovo u slučajevima otkrivanja VUS-a (engl. *variant of unknown significance*) i genomske mutacije koje prethodno nisu bile opisane, kao i u slučajevima kada su genom-

ske mutacije prisutne u pacijenta i jednog od roditelja (pojam varijabilne penetrabilnosti).

Rezultate analize aCGH možemo svrstati u jednu od četiri kategorija:

1. bez klinički značajnih / patoloških preuređenja / CNV
2. prisutnost klinički značajnih preuređenja koja su izravno vezana uz kliničku sliku pacijenta
3. prisutnost VUS-a u pacijenta i jednog od roditelja
4. prisutnost VUS-a samo u pacijenta, ali ne i roditelja.

Prve dvije kategorije jednostavne su za interpretaciju. U trećoj kategoriji, koja je prisutna u približno 5 % slučajeva<sup>29</sup>, značenje preuređenja ovisi i o veličini, lokusu, genetičkoj varijabilnosti i heterogenosti lokusa. U slučaju četvrte kategorije izuzetno je važno i traženje informacija na razini gena koji se nalaze u području preuređenja, njihovih funkcija i potencijalne povezanosti s kliničkim obilježjima pacijenta. Pacijente iz treće i četvrte kategorije potrebno je pratiti i nakon godinu dana ponovo ocijeniti status otkrivenog preuređenja. Moguće je da se u tom vremenu promjena klasificira kao benigna ili patološka.

Genetičko savjetovanje nužan je dio svakog genetičkog testa. Kod metode aCGH posebno je važno provesti genetičko savjetovanje prije i poslije testa, zbog već objašnjene mogućnosti pronalaženja VUS-a. Osim važnosti objašnjenja mogućeg pronalaženja VUS-a potrebno je obrazložiti i mogućnosti metode, odnosno da s jednim testom sada možemo otkriti različite sindrome (za razliku od metode FISH koja može otkriti samo jedan specifični sindrom ili samo subtelomerna preuređenja), da je specifičnost i osjetljivost metode za različite sindrome različita i da se rezolucija metode razlikuje ovisno o laboratoriju. Prije testa potrebna je pisana suglasnost pacijenta u kojoj izjavljuje da se slaže s testom. Genetičko savjetovanje u okviru prenatalne dijagnostike posebno je važno kako bi budući roditelji razumjeli mogućnost otkrivanja VUS-a, te povezano s time donijeli daljnje odluke o nastavku trudnoće.

#### ZAKLJUČAK

Metoda molekularne kariotipizacije, aCGH, značajni je dio kliničke i laboratorijske genetike. Pri-

mjenjuje se u postnatalnoj i prenatalnoj genetičkoj dijagnostici i sve više zamjenjuje klasičnu kariotipizaciju. U postnatalnoj dijagnostici postala je metoda izbora u slučajevima idiopatske mentalne retardacije, zaostajanja u razvoju, dismorfni znakova i prirođenih razvojnih anomalija. U području prenatalne dijagnostike posebice se upotrebljava u slučajevima kada je potrebna analiza cijelog genoma s većom rezolucijom nego onom u klasične kariotipizacije.

#### ZAHVALE

Zahvaljujemo Mariji Volk, dr. med. za identifikaciju prenatalnog kliničkog slučaja.

**Izjava o sukobu interesa:** autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

#### LITERATURA

1. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 2005;14:2:R215–23.
2. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–21.
3. 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.
4. Hosoki K, Ohta T, Natsume J, Imai S, Okumura A, Matsui T et al. Clinical phenotype and candidate genes for the 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;158A:1891–6.
5. Bartholdi D, Stray-Pedersen A, Azzarello-Burri S, Kibaek M, Kirchhoff M, Oneda B et al. A newly recognized 13q12.3 microdeletion syndrome characterized by intellectual disability, microcephaly, and eczema/atopic dermatitis encompassing the HMGB1 and KATNAL1 genes. *Am J Mol Genet* 2014; Forthcoming.
6. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:182–92.
7. Bragin E, Chatzimichali EA, Wright CF, Hurles ME, Firth HV, Bevan AP et al. DECIPHER: database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D993–1000.
8. Vulto-van Silfhout AT, van Ravenswaaij CM, Hehir-Kwa JY, Verwiel ET, Dirks R, van Vooren S et al. An update on ECARUCA, the European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations. *Eur J Med Genet* 2013;56:471–4.
9. Riggs ER, Jackson L, Miller DT, Van Vooren S. Phenotypic information in genomic variant databases enhances clinical care and research: the International Standards for

- Cytogenomic Arrays Consortium experience. *Hum Mutat* 2012;33:787–96.
10. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D986–92.
  11. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56–65.
  12. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 2010; 464:704–12.
  13. 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. *J Med Genet* 2004;41:241–8.
  14. 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. *Am J Hum Genet* 2010;86:749–64.
  15. 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. *Eur J Med Genet* 2009;52:161–9.
  16. Sisodiya SM, Mefford HC. Genetic contribution to common epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2011;24:140–5.
  17. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:229–37.
  18. 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.
  19. Zuffardi O, Vetro A, Brady P, Vermeesch J. Array technology in prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;16:94–8.
  20. 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. *Prenat Diagn* 2012;32: 976–85.
  21. 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. *J Med Genet* 2007;44:750–62.
  22. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cui-sset JM, Sukno S et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur j med gen* 2009;52:291–6.
  23. 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. *Prenat Diagn* 2009;29:29–39.
  24. Lamb AN, Rosenfeld JA, Neill NJ, Talkowski ME, Blumenthal I, Girirajan S et al. Haploinsufficiency of SOX5 at 12p12.1 is associated with developmental delays with prominent language delay, behavior problems, and mild dysmorphic features. *Hum Mutat* 2012;33: 728–40.
  25. Gijsbers AC, Bosch CA, Dauwerse JG, Giromus O, Hansson K, Hilhorst-Hofstee Y et al. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. *Eur J Med Genet* 2010;53:227–33.
  26. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 2010;94:1173–7.
  27. Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reprod Biomed Online* 2010;21:280–2.
  28. Liang L, Wang CT, Sun X, Liu L, Li M, Witz C et al. Identification of chromosomal errors in human preimplantation embryos with oligonucleotide DNA microarray. *PLoS One* 2013;8:e61838.
  29. 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.