

University of Groningen

Detectie van submicroscopische chromosomale afwijkingen door middel van array-diagnostiek

Zwijnenburg, P. J.G.; Lakeman, P.; Pfundt, R.; Klein Wassink-Ruiter, J. S.; Kerstjens-Frederikse, W. S.; Van Ravenswaaij-Arts, C. M.A.

Published in:
Tijdschrift voor Kindergeneeskunde

DOI:
[10.1007/s12456-014-0002-1](https://doi.org/10.1007/s12456-014-0002-1)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Zwijnenburg, P. J. G., Lakeman, P., Pfundt, R., Klein Wassink-Ruiter, J. S., Kerstjens-Frederikse, W. S., & Van Ravenswaaij-Arts, C. M. A. (2014). Detectie van submicroscopische chromosomale afwijkingen door middel van array-diagnostiek: De meerwaarde en de valkuilen in de prenatale en postnatale diagnostiek. *Tijdschrift voor Kindergeneeskunde*, *82*(1), 3-18. <https://doi.org/10.1007/s12456-014-0002-1>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Detectie van submicroscopische chromosomale afwijkingen door middel van array-diagnostiek

De meerwaarde en de valkuilen in de prenatale en postnatale diagnostiek

P.J.G. Zwijnenburg, P. Lakeman, R. Pfundt, J.S. Klein Wassink-Ruiter, W.S. Kerstjens-Frederikse, C.M.A. van Ravenswaaij-Arts; namens de richtlijncommissie VKGN 'Pre- en posttest-counseling bij array-diagnostiek'

Samenvatting

Array-diagnostiek kan submicroscopische chromosoomafwijkingen vaststellen die voorheen met standaardkaryotypering onopgemerkt bleven. In Nederland is sinds 2008 geleidelijk genoombrede array-diagnostiek eerste keus geworden voor het opsporen van (submicroscopische) chromosoomafwijkingen die de oorzaak zijn van verstandelijke beperking en/of aangeboren afwijkingen. Ook wordt sinds 2012-2013 in de meeste centra op materiaal dat verkregen is bij een vlokkentest of vruchtwaterpunctie, na een eerste sneltest op trisomie 21, 18 en 13, gekozen voor array-diagnostiek wanneer echografische afwijkingen aanleiding geven tot prenatale diagnostiek. Met array-diagnostiek wordt postnataal bij 12-15% van de patiënten met een ontwikkelingsachterstand en prenataal bij 6% van de foetussen met echoafwijkingen alsnog een genetische oorzaak vastgesteld indien eerder conventionele karyotypering normaal was. Naast (zeer waarschijnlijk) pathogene bevindingen passend bij het fenotype van patiënt of foetus, worden met array-diagnostiek ook 'unclassified variants' vastgesteld met onduidelijke pathogeniciteit die, met name in de prenatale setting, de beslissing om de zwangerschap wel of niet te behouden, bemoeilijken en gepaard kunnen gaan met emotionele stress. Ook kunnen pathogene afwijkingen worden gevonden die geen directe relatie hebben met het fenotype maar die informatie over de eigen gezondheid geven en relevant kunnen zijn voor familieleden. Als toevalsbevinding kan bijvoorbeeld een deletie van een kankerpre-dispositie-gen gevonden worden. Al tijdens de pretest-counseling moet uitgebreide aandacht zijn voor deze mogelijke bevindingen en hun (ongewenste) implicaties. Desondanks kunnen dergelijke uitkomsten de posttest-counseling bemoeilijken. Iedere aanvrager van array-diagnostiek dient zich bewust te zijn van deze implicaties. Aan de hand van twee prenatale en vier postnatale casus worden de meerwaarde, en ook de beperkingen en valkuilen van array-diagnostiek geïllustreerd.

Inleiding

Het standaard microscopisch chromosomenonderzoek – de conventionele 'karyotypering' – is sinds de jaren zestig van de vorige eeuw niet meer weg te denken in de diagnostiek naar de oorzaak van verstandelijke beperking en/of aangeboren afwijkingen. Met deze techniek is het sinds 1959 mogelijk om het Down-syndroom (trisomie 21) en andere aneuploidieën op het niveau van de chromosomen te bevestigen. Maar ook voor het vaststellen van (on)gebalanceerde translocaties en inversies, markerchromosomen, deleties en duplicaties met een grootte vanaf ongeveer 5-10 Mb bleek karyotypering een geschikte techniek (1 Mb = 1.000.000 basenparen). Vanaf eind jaren tachtig kon het standaard microscopisch onderzoek worden aangevuld met fluorescentie-in-situ-hybridisatie (FISH). Door het gericht aankleuren van een klein stukje chromosoom kan hiermee het klinisch vermoeden op een microdeletie, óók kleiner dan 5 Mb, worden bevestigd. Een voorbeeld hiervan is de microdeletie 22q11.2, verantwoordelijk voor het velocardiofaciaal syndroom (VCF), die een grootte heeft van 1,5 tot maximaal 3 Mb en dus niet met het standaard microscopisch onderzoek aangetoond kan worden. Karyotypering en FISH behoren al enkele decennia tot de diagnostische mogelijkheden van onder andere de kinderarts en de klinisch geneticus, en ze hebben een diagnostische opbrengst van ongeveer 5%. Het standaardchromosomenonderzoek is terecht opgenomen in de NVK-richtlijn 'Mentale retardatie' uit 2005.¹ Ook in de prenatale screening en diagnostiek werd het mogelijk om chromosomenonderzoek te

verrichten op materiaal verkregen via chorionvillusbiopsie (CVB; de vlokentest) vanaf 11-12 weken amenorroeduur of via een amnionpunctie (AP; de vruchtwaterpunctie) vanaf 16 weken. Sinds de jaren zeventig wordt in ons land prenatale screening op Down-syndroom en andere chromosoomafwijkingen aangeboden aan zwangeren van 36 jaar en ouder en prenatale diagnose bij het vermoeden op aangeboren afwijkingen bij de foetus.²

Microdeleties en -duplicaties kleiner dan 5 tot 10 Mb kunnen niet met standaardchromosomenonderzoek worden aangetoond. Sinds de komst van de array-diagnostiek (array-CGH en SNP-array) kunnen deze kleinere afwijkingen nu wel worden aangetoond en blijkt bij een additionele 12-15% van de aangedane en reeds met karyotypering onderzochte kinderen alsnog een genetische oorzaak te kunnen worden vastgesteld.^{3,4} Ook nadat eerst bijvoorbeeld met FISH- of MPA-onderzoek naar deleties of duplicaties van de subtelomere regio's of de regio's van bekende deletie- en duplicatiesyndromen van de chromosomen is gekeken.³ In Nederland is sinds 2008 het microscopisch chromosomenonderzoek geleidelijk vervangen door genoombrede array-diagnostiek als methode van eerste keus voor het opsporen van chromosomale afwijkingen als oorzaak van aangeboren problemen, verstandelijke beperking en gedragsproblemen. Sinds 2012-2013 is ook in de prenatale setting de routinekaryotypering vervangen door een nieuwe aanpak. Hierbij wordt eerst met een zogenaamde sneltest (QF-PCR) bepaald of er sprake is van trisomie 21, trisomie 18 of trisomie 13 of een aneuploidie van de geslachtschromosomen. Als met deze sneltest geen afwijking is gevonden, wordt in de meeste academische centra geen verder onderzoek verricht bij de indicaties maternale leeftijd en/of een verhoogd risico uit de combinatietest. Is er echter sprake van bijvoorbeeld een persisterende verdikte nekplooi (NT) of structurele afwijkingen bij echo-onderzoek, dan wordt array-diagnostiek in plaats van karyotypering aan de zwangere en haar partner aangeboden. In een Amerikaanse studie van 4400 prenatale samples met een normaal karyotype werd bij ongeveer 6% van de foetussen met structurele echografische afwijkingen door middel van array-analyse een oorzakelijke genetische afwijking gevonden. Bij de zwangerschappen waarbij sprake was van een hoge maternale leeftijd (36 jaar en ouder) of een verhoogd risico uit de combinatietest, was dit in 1,7% het geval.⁵ In deze laatste groep ging het in 0,5% van de geval-

len om een zekere pathogene array-afwijking, terwijl de rest potentieel klinisch relevant was.

Dit artikel bespreekt de absolute meerwaarde van array-onderzoek ten opzichte van conventionele karyotypering, mede aan de hand van prenatale en postnatale casuïstiek. Tevens zullen de beperkingen van deze vorm van genoombrede analyse op DNA-niveau naar copy number variations (CNV's) worden besproken. Indicaties voor het aanvragen van pre- en postnatale array-diagnostiek en adviezen ten aanzien van de counseling over mogelijke uitslagen voorafgaande aan de test worden beschreven. Ook wordt besproken hoe in de posttest-counseling om te gaan met mogelijk onverwachte bevindingen, zoals onduidelijke uitslagen of toevallig gevonden afwijkingen. De aanvrager van array-diagnostiek dient zich hiervan bewust te zijn.

Begrip van de betekenis en bruikbaarheid van de huidige diagnostische technieken zijn belangrijk voor onder anderen de kinderarts, de gynaecoloog, de klinisch geneticus en/of neuroloog bij het toepassen van dergelijke technieken in de dagelijkse praktijk.

Techniek

Array-onderzoek is géén vorm van chromosomenonderzoek, er worden immers geen indivi-

Afkortingen

AP	amnionpunctie
CVB	chorionvillusbiopsie
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
ECARUCA	European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations
FISH	fluorescentie-in-situ-hybridisatie
ISCA	International Standards for Cytogenomic Arrays
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
NVK	Nederlandse Vereniging voor Kindergeneeskunde
NVOG	Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie
NT	nuchal translucency
VKGL	Vereniging Klinisch Genetische Laboratoriumdiagnostiek
VKGN	Vereniging Klinische Genetica Nederland
WGBO	Wet op de geneeskundige behandelingsovereenkomst
QF-PCR	quantitative fluorescence-polymerase chain reaction

duale cellen bestudeerd zoals bij chromosomenonderzoek en FISH het geval is. Het is wel net als chromosomenonderzoek een genoombrede analyse, echter op DNA-niveau en met een veel hogere resolutie, tot ruim honderd keer hoger dan bij microscopisch onderzoek. Voor array-diagnostiek is daarom DNA nodig dat uit verschillende weefsels verkregen kan worden. Meest gebruikt zijn perifeer (EDTA) bloed, huid, vruchtwater en chorionvlokken. De techniek is gericht op het herkennen van zogenoemde *copy number variations* (CNV's; deleties of duplicaties). Er kan sprake zijn van een deletie van een reeds bekende ziekte-/syndroomregio, leidend tot bijvoorbeeld een bekend microdeletiesyndroom, zoals het 22q11.2-deletiesyndroom (voorheen DiGeorge-/velocardiofaciaal syndroom) of het 4p-syndroom (Wolf-Hirschhorn-syndroom), klinisch goed herkenbare aandoeningen die ook al met gericht FISH-onderzoek konden worden vastgesteld. Ook een aneuploidie, zoals een trisomie 21, is aantoonbaar met array-onderzoek. De introductie van array-diagnostiek heeft echter ook geleid tot identificatie van nieuwe microdeletiesyndromen met een herkenbaar fenotype, zoals de 9q34-deletie (Kleefstra-syndroom) en de 17q21.31-deletie (Koolen-De Vries-syndroom). De exacte genetische lokalisatie van deleties, die mogelijk is dankzij array-diagnostiek, heeft ook geleid tot de identificatie van de genen die verantwoordelijk lijken te zijn voor deze syndromen, respectievelijk EHMT1 en KANSL1.^{6,7} In de praktijk worden ook veel deleties en/of duplicaties (CNV's) gevonden die nog niet eerder zijn beschreven, maar die op basis van bijvoorbeeld hun grootte, mogelijk overervingspatroon en geneninhoud wel als oorzakelijk kunnen worden beschouwd. De betreffende patiënt is dan vooralsnog uniek. In verscheidene databases worden dergelijke patiënten verzameld in de hoop op termijn andere patiënten te vinden met dezelfde of overlappende CNV's. Naast microdeletie- en microduplicatiesyndromen waarbij sprake is van volledige penetrantie, dat wil zeggen dat de CNV altijd tot een klinisch effect leidt, zijn er ook CNV's die weliswaar duidelijk geassocieerd zijn met een bepaald ziektebeeld, maar die ook gevonden kunnen worden in de gezonde ouders van een patiënt, of bij gezonde controle-individuen. Een selectiebias bij het verrichten van array-diagnostiek heeft aanvankelijk de rol van een aantal CNV's in het ontstaan van verstandelijke beperking sterk vertekend. Langzaam wordt echter duidelijk dat der-

gelijke CNV's vaker voorkomen bij patiënten met een fenotype dan bij controles en dus een relatief risico geven op met name ontwikkelingsachterstand.⁸ Bij deze array-bevindingen is het klinisch beeld van de patiënt in vergelijking met dat van andere personen met een vergelijkbare CNV belangrijk om te kunnen concluderen of de bevinding een volledige of gedeeltelijke verklaring voor het fenotype van de patiënt is.

Soms kan er sprake zijn van een deletie of duplicatie van één gen of een gedeelte van een gen. Een dergelijke bevinding kan een volledige verklaring voor het fenotype zijn, zoals een deletie van het NSD1-gen bij een beeld passend bij Sotos-syndroom. Als er sprake is van een deletie van een gen betrokken bij autosomaal recessieve overerving, kan de array-bevinding een aanwijzing voor een diagnose geven. Een voorbeeld hiervan is een deletie van het COH1-gen, bij een klinisch beeld passend bij Cohen-syndroom. Dit is een indicatie om te zoeken naar een oorzakelijke mutatie op het andere allel om de diagnose te bevestigen.⁹ In dergelijke gevallen is er sprake van een klassiek recessief ziektebeeld, waarbij de deletie van de ene ouder overgeërfd is en er sprake is van een mutatie op het tweede allel van de andere ouder.

Array-diagnostiek stelt ook CNV's vast waarvan de betekenis onduidelijk of onbekend is; we spreken dan van *unclassified variants* (UV's) of *variants of unknown significance* (VOUS). Er kan een onderverdeling in deze varianten gemaakt worden naar waarschijnlijkheid dat de variant pathogeen (ziekteveroorzakend) is, onder andere op basis van de overerving (voorkomen bij ouders), het voorkomen in de algemene bevolking, het voorkomen van vergelijkbare/overlappende CNV's in andere patiënten (in combinatie met hun klinische fenotype), ziektegenen in het gebied en de grootte van de betreffende CNV. Er wordt gewerkt aan een landelijke afstemming van deze classificatie. Prenataal wordt naar schatting in 2,1% (95%-BI 1,3-3,3%) van de samples een UV/VOUS gevonden als de indicatie voor de array een echoafwijking betreft en in 1,4% (95%-BI 0,5-3,7%) van de aanvragen als alle prenatale indicaties worden meegeteld.⁵ Hierbij dient te worden opgemerkt dat de kans op een VOUS niet alleen afhankelijk is van de indicatie, maar tevens van onder andere het array-platform en de rapportagecriteria.

Er bestaan twee vormen van array-diagnostiek (figuur 1 en 2).

– Array-CGH. Bij *array-based comparative genomic*

hybridization (array-CGH) wordt het DNA van een patiënt vergeleken met dat van gezonde personen. Verspreid over het hele genoom worden hiervoor vele tien- tot honderdduizenden meetpunten (kleine stukjes DNA = oligonucleotiden, probes) bekeken. Door het kwantitatief vergelijken van fluorescent gelabeld DNA van een patiënt, met fluorescent gelabeld DNA van gezonde controlepersonen, kan voor elke meetpunt (oligonucleotide/probe) bepaald worden of bij de patiënt het normale aantal kopieën aanwezig is. Als er één of meer kopieën te weinig (bij een deletie/loss) of te veel (bij een duplicatie/gain) zijn in het genomisch materiaal van de patiënt, dan leidt dit tot een respectievelijk verlaagd of verhoogd signaal van de betreffende array-probes ten opzichte van de controle.

- SNP-array. Een tweede vorm is de *single nucleotide polymorphism array* (SNP-array). SNP's zijn (onschuldige) variaties in het genoom die steeds een enkel nucleotide betreffen en die kunnen verschillen tussen individuen. Bij SNP-arrays wordt een identieke procedure gehanteerd als bij de hierboven beschreven array-CGH. Vele honderdduizenden probes bepalen de relatieve kopie aantallen van een patiënt ten opzichte van gezonde controles door het vergelijken van signalen, waardoor deleties en duplicaties kunnen worden opgespoord. Bij een SNP-array zijn de array-probes echter zo gekozen dat er naast de informatie over de relatieve hoeveelheid DNA-materiaal, ook informatie gegeven wordt over de SNP op deze positie. Op deze manier worden tienduizenden tot vele honderdduizenden SNP's verspreid over het genoom getypeerd. Deze SNP-typering (het haplotype) kan gebruikt worden als een interne bevestiging van een vastgestelde CNV, maar belangrijker: behalve deleties en duplicaties kunnen ook zogenoemde homozygote gebieden geïdentificeerd worden. In homozygote regio's wordt bij een grote serie van opeenvolgende SNP's steeds hetzelfde allel in tweevoud gemeten; op het chromosoom van maternale afkomst zijn de SNP's dan identiek aan de SNP's op het chromosoom van paternale afkomst. De identificatie van veel/grote gebieden van homozygotie is een aanwijzing voor verwantschap (consanguïniteit) tussen de ouders van de onderzochte patiënt. Hoe nauwer de verwantschap tussen twee ouders is, hoe meer homozygote regio's bij het betreffende kind gevonden zullen worden. Deze homozygote

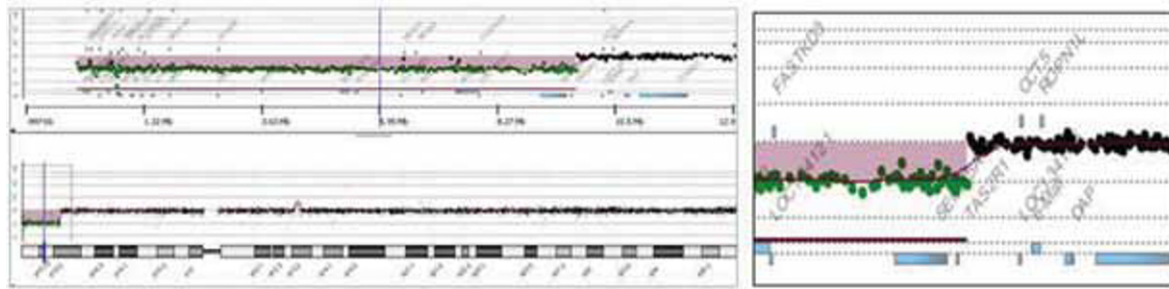
gebieden, ook wel *regions of homozygosity* (ROH) genoemd, kunnen daardoor richting geven aan verdere diagnostiek door het identificeren van kandidaatgenen bij een verdenking op een recessief ziektebeeld. Er zijn methoden/hulpmiddelen waarmee in ROH-gebieden gezocht kan worden naar (OMIM-)genen die geassocieerd zijn met een specifiek fenotype. Men moet zich realiseren dat op deze manier ook zeer nauwe verwantschap zoals bij incest kan worden aangetoond. Grote homozygote gebieden (langer dan 4-5 Mb) zijn zeer uitzonderlijk bij personen uit families waar geen sprake is van bloedverwantschap.

De laatste generatie arrays bevat vaak een combinatie van probes die alleen de kopie aantallen bepalen (*copy-number probes*) en probes die kopie aantallen en SNP-typeringsinformatie genereren (SNP-probes). Deze combinatie zorgt voor een hoge resolutie met een gelijkmatige genomische dekking en haplotyperingsinformatie.

Een bijzondere vorm van homozygotie zijn UPD's (uniparentale disomieën), waarbij voor een chromosoom twee kopieën van één ouder aanwezig zijn en één van de ander. Een bekend voorbeeld hiervan is een UPD van chromosoom 15 die oorzakelijk is voor het Prader-Willi-syndroom (twee kopieën van moeder) of het Angelman-syndroom (twee kopieën van vader). Met SNP-analyse kunnen ook deze UPD's geïdentificeerd worden, inclusief de parentale herkomst, maar alleen als de ouders ook met SNP-array zijn onderzocht, voor de juiste klinische interpretatie. Wanneer een UPD bestaat uit twee identieke allelen (een verdubbeling van één van de allelen van één ouder), is er sprake van homozygotie; we noemen dit isodisomie. Er kan ook sprake zijn van een UPD, waarbij beide allelen afkomstig zijn van dezelfde ouder, maar waarbij het twee verschillende allelen van dezelfde ouder betreft, we noemen dit heterodisomieën. Heterodisomieën zijn niet detecteerbaar met een SNP-array. Daarnaast bieden SNP-analyses de mogelijkheid van koppelingsonderzoek (haplotypering) binnen families.

Tabel 1 vat samen welk type bevindingen gedaan kan worden door middel van array-diagnostiek. De uitslag van array-diagnostiek is doorgaans na vier tot zes weken bekend, maar kan in een spoedsituatie ook sneller verkregen worden. Als in de prenatale setting de 20-wekenecho aanleiding geeft voor array-diagnostiek dan is het een uitdaging voor het laboratorium om de uitslag,

Figuur 1: Voorbeeld van data van de Agilent array-CGH van chromosoom 5. Er is een deletie zichtbaar in 5p15.33p15.2 (9,97 Mb-deletie; cri-du-chat-syndroom). De deletie is zichtbaar als een verlaging van de test/referentie ratiolijn en als groene datapunten in de scatterplot. Rechts is een detail van een deel van de deletie te zien.

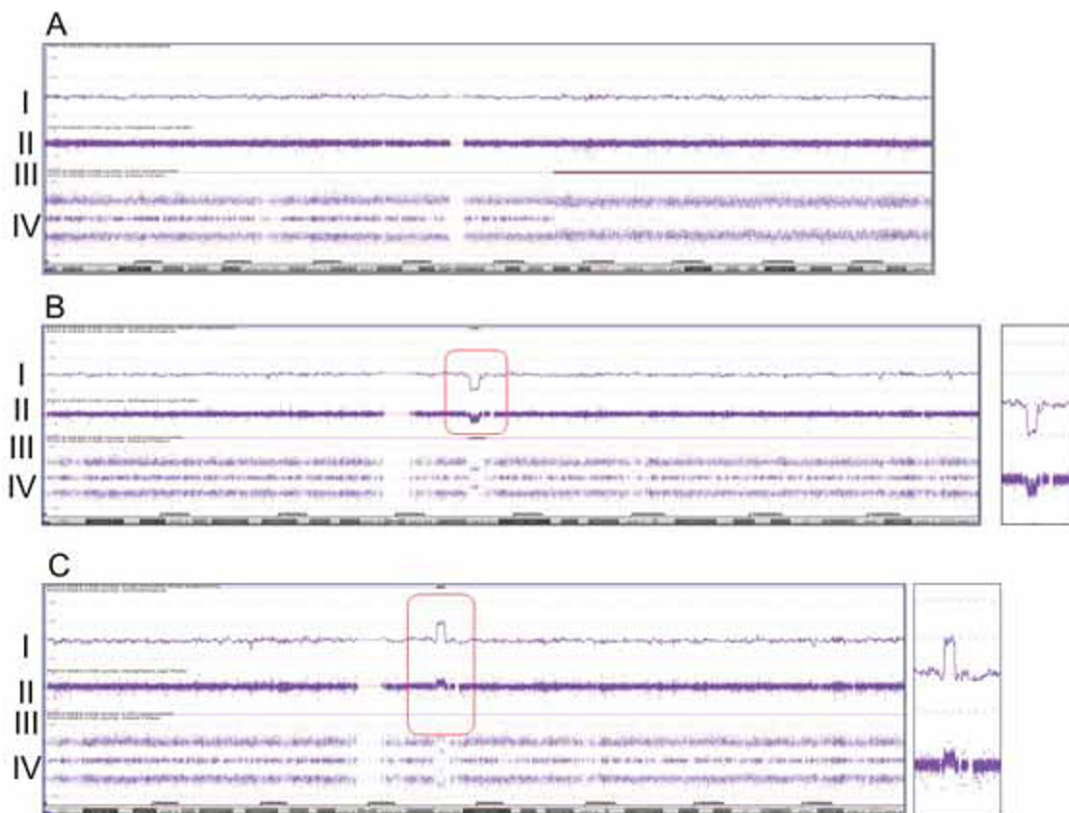


Figuur 2: Voorbeelden van een CytoscanHD (SNP-)array.

A. Voorbeeld van data van de CytoscanHD (SNP-)array van chromosoom 3. Geen copy number variations (CNV) detecteerbaar (test/referentie ratiolijnen I en II) lopen vlak. Er is een groot (> 84 Mb) homozygoot gebied zichtbaar 3qter (door paarse balk in datalijn III en het ontbreken van de middelste SNP's (heterozygote) in datalijn IV). Dit beeld is indicatief voor een uniparentale disomie van chromosoom 3 (UPD(3)).

B. Voorbeeld van data van de CytoscanHD (SNP-)array van chromosoom 7. Er is een microdeletie zichtbaar in 7q11.23 (1,4 Mb-deletie; Williams-Beuren-syndroom). De deletie is zichtbaar als een verlaging in test/referentie ratiolijnen I en II (zie rood kader en vergroting aan de rechterkant van de figuur). De deletie is tevens zichtbaar als een verlies van één allel in de SNP-data (paarse balk in datalijn III en verandering van het allelpatroon in datalijn IV (verlies van één allel).

C. Voorbeeld van data van de CytoscanHD (SNP-)array van chromosoom 7. Er is een microduplicatie zichtbaar in 7q11.23 (1,4 Mb-duplicatie van de regio die bij deletie leidt tot het Williams-Beuren-syndroom). Dit syndroom staat echter bekend als het 7q11.23-duplicatiesyndroom. De duplicatie is zichtbaar als een verhoging in de test/referentie ratiolijnen I en II (zie rood kader en vergroting aan de rechterkant van de figuur). De duplicatie is tevens zichtbaar als een verandering van het allelpatroon in datalijn IV (winst van één allel).



inclusief de interpretatie, voor de 24e zwangerschapsweek af te hebben. Om die reden wordt voor aanvang van de test ook meteen bloed bij de ouders geprikt voor DNA-isolatie. Mocht de array van de foetus een bevinding opleveren waarvan de pathogeniciteit en causaliteit niet vaststaan, dan kan ter vergelijking direct naar het DNA van ouders worden gekeken. Wordt een CNV niet bij een van de biologische ouders teruggevonden dan is dat in de regel een extra aanwijzing dat deze pathogeen is. We spreken dan van een de novo ontstane CNV. Wanneer de CNV wordt teruggevonden bij een fenotypisch normale ouder (parentale CNV) dan wordt de CNV vaker als klinisch niet relevant beschouwd, met name in het geval van een overerfde duplicatie. Het is van belang zich te realiseren dat er vele voorbeelden zijn van pathogene CNV's die bij gezonde ouders worden teruggevonden; we spreken dan van incomplete penetrantie of dragerschap. Het terugvinden van een CNV bij één van de ouders wil dan ook niet zeggen dat er geen causaal verband is tussen het fenotype en de CNV; de pathogeniciteit zal per CNV beoordeeld moeten worden.

Beperkingen van array-onderzoek

Het is van belang dat de aanvrager zich realiseert dat er ook genetische afwijkingen zijn die door middel van array-diagnostiek niet of beperkt aantoonbaar zijn.

Dragerschap van een gebalanceerde chromosoomtranslocatie of -inversie is niet zichtbaar bij array-diagnostiek, aangezien de uitwisseling van genetisch materiaal tussen niet-homologe chromosomen of het omkeren van een stukje van een chromosoom niet hoeft te leiden tot verlies of winst van genetisch materiaal. Een gebalanceerde translocatie of inversie leidt veelal tot reproductieve beperkingen vanwege het verhoogde risico op een ongebalanceerde chromosomale afwijking bij het nageslacht. Wanneer de indicatie voor chromosomenonderzoek het voorkomen van herhaalde miskramen is, en de vraagstelling dus is of er sprake is van een gebalanceerde translocatie, dan zal conventionele karyotypering en geen array-onderzoek plaatsvinden. Een (veelal de novo) gebalanceerde translocatie of inversie kan echter ook tot problemen leiden, zoals een ontwikkelingsachterstand of een aangeboren afwijking wanneer het breukpunt door een coderende of regulatoire sequentie loopt. Naar schatting veroorzaakt 6,7% van de prenataal met conventionele karyotypering vastgestelde de novo, ogenschijnlijk gebalanceerde translocaties een fenotype.¹⁰ Ogenschijnlijk de novo gebalanceerde translocaties na karyotypering blijken echter vaak bij array-diagnostiek toch gepaard te gaan met een kleine deletie.^{11,12} De novo translocaties die bij array-onderzoek echt gebalanceerd zijn maar wel een fenotype geven, zijn waarschijnlijk erg zeldzaam.

De array-diagnostiek is beperkt in staat mozaïcisme voor chromosomale afwijkingen te detecteren. De oligo-array kan 20% of meer mozaïcisme herkennen, de SNP-array is gevoeliger voor het detecteren van mozaïcisme tot zelfs < 10% (afhankelijk van de grootte van de afwijking).¹³ Traditionele karyotypering kan 26% mozaïcisme uitsluiten met een 95%-betrouwbaarheidsinterval wanneer tien cellen worden geanalyseerd, wat gebruikelijk is in Nederland.¹⁴ Een triploïdie is met array-CGH niet, maar met SNP-array wel aantoonbaar. Bij verdenking op een triploïdie wordt vaak de voorkeur gegeven aan karyotypering, mede omdat daarmee ook een mozaïektriploïdie kan worden aangetoond. Een array kan wel aantonen of er genetisch materiaal te veel aanwezig is, maar niet waar dit materiaal zich bevindt. Dat laatste kan belang-

Tabel 1: Mogelijke bevindingen bij array-diagnostiek

causaal	<ul style="list-style-type: none"> • bekende microdeletie- en microduplicatiesyndromen • aneuploïdie • ongebalanceerde translocatie • deleties van één ziektegen of intragene deleties[#] • grote genomische onbalansen: (cytogenetisch zichtbare) duplicaties en deleties
mogelijk causaal	<ul style="list-style-type: none"> • unclassified variant • bekende deleties en duplicaties met incomplete penetrantie • UPD*
mogelijk causaal/richtinggevend	<ul style="list-style-type: none"> • CNV recessief overervend gen passend bij fenotype • gen passend bij fenotype in ROH*
verwantschap	<ul style="list-style-type: none"> • non-paterniteit** • zygositeit (eeneiige of meereeiige meerling)* • parentale consanguïniteit,* incest*
toevalsbevinding	<ul style="list-style-type: none"> • deletie ziekte-gen niet gerelateerd aan fenotype (bijv. oncogen, cardiogen) • dragerschap autosomaal recessieve aandoening • aneuploïdie X-Y

[#] Dit is sterk afhankelijk van de resolutie en (lokale) dekking van de gebruikte array.

* Alleen bij SNP-array of gecombineerde array-platforms met zowel CN- als SNP-probes, niet bij enkel array-CGH.

** Non-paterniteit is pas aantoonbaar als patiënt-ouderdata beschikbaar zijn voor analyse.

rijk zijn voor het bepalen van de pathogeniciteit (bij een ogenschijnlijk intragene duplicatie, zie casus 6) of voor het bepalen van het herhalingsrisico (bijvoorbeeld of de gain het gevolg is van een markerchromosoom of van een ongebalan- ceerde translocatie). Daarom is bij een afwij- kende array-bevinding vaak nog aanvullend chromosomen- of FISH-onderzoek nodig.

Alhoewel beide vormen van array ten gevolge van de grote hoeveelheid probes een hoge reso- lutie hebben, is het toch mogelijk dat er sprake is van een deletie of duplicatie die onder de de- tectiegrens valt. De detectiegrens wordt vastge- steld in de analyse en beslaat over het algemeen een aantal opeenvolgende probes of SNP's. Wanneer het klinisch beeld suggestief is voor de rol van een specifiek gen, kan het daarom zinvol zijn in de analyse specifiek naar dit gen te kijken. Als de gebruikte array een goede dek- king rond een gen van interesse heeft, kunnen zeer kleine CNV's worden gedetecteerd. Ook CNV's onder de detectiegrens kunnen dan in- formatief zijn. Dit onderstreept het grote belang van het vermelden van klinische gegevens of specifieke verdenkingen op de aanvraag.

Uiteraard zijn er vele gradaties van verstandelij- ke beperking, congenitale afwijkingen en syn- dromale aandoeningen die niet veroorzaakt worden door een deletie of een duplicatie, maar bijvoorbeeld door een puntmutatie, een repeat- expansie of afwijkende methylering van een gen. Deze genetische afwijkingen kunnen niet met array-diagnostiek gedetecteerd worden en gericht genetisch onderzoek van het betreffende gen dient verricht te worden.

Toevalsbevindingen

Omdat array-diagnostiek een screenend ge- noombreed onderzoek is, bestaat er ook een kans op toevalsbevindingen. Deleties of duplica- ties van genen die betrokken zijn bij onder meer neurogenetische, cardiogenetische en oncoge- netische aandoeningen, kunnen gevonden wor- den zonder dat er een relatie met het fenotype lijkt te zijn. Soms is een dergelijke bevinding evi- dent pathogeen en aanleiding voor bijvoorbeeld een screeningsadvies en/of een advies voor ver- der familieonderzoek. Soms is de pathogeniciteit minder duidelijk, omdat bijvoorbeeld onbekend is of een deletie eenzelfde effect kan hebben als eerder beschreven puntmutaties in het betref- fende gen. Daarnaast kan als toevalsbevinding dragerschap van een recessieve aandoening, niet gerelateerd aan het fenotype, worden vastge-

steld. Over het algemeen zal de betreffende CNV dan van een van de ouders overgeërfd zijn. Dit kan van belang zijn voor ouders of andere familieleden bij het maken van geïnformeerde reproductieve keuzes. Als immers de partner drager is van een verandering in hetzelfde gen, dan heeft het paar bij elke zwangerschap een ri- sico van 25% op een aangedaan kind.

De interpretatie van array-bevindingen is de ver- antwoordelijkheid van de genetische laboratoria (VKGL), waarbij indien nodig de klinisch gene- ticus wordt geconsulteerd. In veel centra bestaat een overlegstructuur tussen klinisch-genetisch laboratoriumspecialisten en klinisch geneti- ten behoeve van de interpretatie van de uitslag. De uitslagrapportage dient te voldoen aan inter- nationale richtlijnen.¹⁵ Welke bevindingen in de uitslag dienen te komen is van primair belang voor de pre- en posttest-counseling.

Het humane genoom kent enorm veel variatie. Het duiden van een CNV als wel of niet patho- geen is complex. Wereldwijde databases met be- kende variaties zijn essentieel in dit proces. DE- CIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk>) en ECA- RUCA (www.ecaruca.net) zijn web-based databases van genomische variaties (waaronder CNV's) van meer dan 21.000 patiënten. De Da- tabase of Genomic Variants (DGV) is een andere database van structurele genomische variaties in de mens. Het International Standards for Cyto- genomic Arrays (ISCA) Consortium houdt zich bezig met het verbeteren van array-diagnostiek en beheert een database met array-data van de laboratoria die deel uitmaken van het consor- tium. Ook op nationaal niveau bestaan samen- werkingsverbanden en databases om array-be- vindingen en -ervaringen te delen.

Counseling

Momenteel werkt de VKGN in samenwerking met de NVK en NVOG aan een richtlijn 'Pre- en posttest-counseling bij array-diagnostiek', waarbij onderscheid gemaakt zal worden tussen postnatale en prenatale array-diagnostiek. Con- form de WGBO dienen patiënten voor het inzet- ten van een onderzoek geïnformeerd te worden over de voor- en nadelen van het onderzoek ten- einde geïnformeerd toestemming te kunnen ge- ven. Deze toestemming dient aangetekend te worden in het dossier (een ondertekende toe- stemmingsverklaring is niet nodig).

De mate waarin pretest-counseling plaatsvindt kan sterk variëren tussen de prenatale en postna- tale setting. In de zoektocht naar een genetische

diagnose voor een kind met een ontwikkelingsachterstand, zijn ouders goed te informeren over het nut en de meerwaarde van array-diagnostiek. Het fenotype van het kind (en ouders) is meestal bekend en een aangetoonde de novo microdeletie of -duplicatie is vervolgens ook goed te vergelijken met de kliniek van de patiënt en de beschrijving in de literatuur. In de acute setting van een neonatale intensiverecare-unit is het echter voorstelbaar dat de pretest-counseling minder uitgebreid plaatsvindt en dat vooral achteraf bij het vaststellen van afwijkingen uitgebreide klinisch-genetische counseling wordt verricht. Toch dient ook in deze setting aandacht te zijn voor het vooraf informeren van de ouders, eventueel schriftelijk, over de mogelijkheid van het vaststellen van toevallsbevindingen bij hun kind en eventueel ook bij henzelf, die het fenotype niet verklaren, maar wel relevant zijn voor de (latere) gezondheid van hun kind.

Het inzetten van array-diagnostiek wordt in de prenatale setting steeds meer toegepast als een diagnostisch middel om de oorzaak voor echoafwijkingen op te sporen en hiermee aanstaande ouders de mogelijkheid te bieden om een autonome reproductieve keuze te maken ten aanzien van de zwangerschap. De situatie is in de prenatale setting vaak complexer dan postnataal. Het fenotype van de baby is minder duidelijk door de beperkingen van de prenatale beeldvormende diagnostiek en door het feit dat niet alle afwijkingen echografisch zijn vast te stellen (bijvoorbeeld ontwikkelingsachterstand, doofheid en blindheid). Daarbij komt dat de ouders de keuze hebben om bij afwijkende bevindingen een zwangerschap te beëindigen. Het vaststellen van CNV's met een onduidelijke betekenis of met verminderde penetrantie is voor aanstaande ouders (en counselors) zeer stressvol, omdat de beslissing – de zwangerschap wel of niet behouden – gemaakt zal moeten worden op basis van een uitslag met een onzekere betekenis. Het is essentieel dat ouders hier vooraf goed over worden geïnformeerd. Psychosociale zorg is belangrijk bij de begeleiding in deze onzekere periode.

Als met array-diagnostiek prenataal een toevallsbevinding wordt vastgesteld, zal uiteraard lang niet altijd worden gekozen om de zwangerschap te beëindigen. Op deze wijze komt reeds informatie beschikbaar over de foetus en het toekomstige kind die pas later in het leven relevant wordt (bijvoorbeeld bij het aantonen van een deletie van een 'darmkanker-gen'). De mogelijkheid om niet geïnformeerd te willen worden

over dergelijke risico's is het kind dan feitelijk prenataal al ontnomen.¹⁶ Hier dient continue aandacht voor te zijn vóór aanvang van de test en idealiter zijn ouders voorafgaand aan het inzetten van array-diagnostiek door de aanvrager gecounseld over de mogelijke uitkomsten en implicaties.¹⁷ In de internationale literatuur is veel geschreven over hoe om te gaan met dergelijke implicaties, en is onder andere de vraag gesteld of ouders de keuze moet worden gegeven of zij wel of niet over bepaalde uitkomsten geïnformeerd zouden willen worden. Zowel voor de prenatale setting als voor de postnatale setting geldt dat als er afspraken gemaakt zijn met ouders over welke uitslagen wel of niet zullen worden meegedeeld, dit in het dossier dient te worden genoteerd en bij voorkeur ook op het aanvraagformulier. Bij het wel of niet meedelen van bevindingen wordt onderscheid gemaakt tussen de (be)handelbare en niet-behandelbare, later in het leven optredende aandoeningen. Ondanks dat 'het recht op niet-weten' geschaad zou kunnen worden, wordt in zowel Amerikaanse als Europese richtlijnen geadviseerd de keuze niet alleen bij de patiënt te laten. De arts of aanvrager van de test moet de mogelijkheid hebben om belangrijke informatie over de toekomstige gezondheid van de patiënt zelf, die ook relevant is voor andere familieleden, toch te vertellen als er sprake is van belangrijke handelingsopties (bijvoorbeeld vroegdiagnostiek). Hierbij kan dus het 'recht op niet-weten' ondergeschikt gemaakt worden.

Bij array-diagnostiek is het tevens mogelijk om deleties van recessieve ziektegerelateerde genen vast te stellen. Indien het om een aandoening gaat met een relatief hoge dragerschapfrequentie of die past bij het klinische beeld van de patiënt, is het aan te bevelen dit wel te bespreken. In individuele gevallen zal met SNP-array kunnen worden vastgesteld dat er sprake is van een consanguïene relatie of dat het vermoeden bestaat op een incestueuze relatie of non-paterniteit. Het is aan de clinicus om in te schatten of het bespreken van een dergelijke bevinding in de posttest-counseling in de betreffende situatie klinisch relevant, gewenst of verplicht is. Deze complexe aspecten zullen ook aan de orde komen bij het ontwikkelen van de richtlijn 'Pre- en posttest-counseling bij array-diagnostiek'. Los van bovenstaande ethische dilemma's spreekt het voor zich dat ouders vooraf worden geïnformeerd over het feit dat array-diagnostiek niet alle genetische afwijkingen kan detecteren.

Indicatie voor de aanvraag van array-diagnostiek

Prenataal

In zeven van de acht academische centra is het momenteel geen standaardbeleid om bij alle vrouwen die prenatale diagnostiek vragen direct array-diagnostiek te verrichten, maar om eerst één of meer tussenstappen in te bouwen. In de huidige prenatale zorg worden prenatale screening en diagnostiek en de daarbij gebruikte technieken volgens een cascade toegepast. Aan alle zwangeren, ongeacht de leeftijd, wordt in het eerste trimester een combinatie-test aangeboden en echografisch onderzoek bij een zwangerschapstermijn van 20 weken. De combinatie-test bestaat uit een bloedonderzoek, waarbij de zwangerschapshormonen vrij- β -hCG en PAPP-A gemeten worden in het bloed van de moeder. Deze waarden worden samengevoegd met de waarde van de nekplooi meting (NT-meting, een echografische meting rond 11-13 weken amenorroeduur) in een risicoberekeningsprogramma. Samen met de leeftijd van de moeder en de zwangerschapsduur geeft dit een uiteindelijk risico (en dus géén zekerheid) op de meest frequente aneuploidieën, te weten Down-syndroom (trisomie 21), Edwards-syndroom (trisomie 18) en Patau-syndroom (trisomie 13). Bij een verhoogd risico kan gekozen worden voor invasieve prenatale diagnostiek (vlokkentest of vruchtwaterpunctie). Zwangeren van 36 jaar en ouder mogen ook direct kiezen voor invasieve prenatale diagnostiek op basis van de maternale leeftijd.

In het verleden werd het materiaal van de vlokkentest (afname vanaf 11 weken amenorroeduur) of de vruchtwaterpunctie (afname vanaf 16 weken amenorroeduur) eerst gekweekt en vervolgens werd conventionele karyotypering toegepast. De uitslag werd na circa drie weken verkregen. Deze methode is nu vervangen door nieuwe, aanzienlijk snellere technieken die ofwel minder chromosomen in kaart brengen (QF-PCR, in zeven centra), ofwel juist in staat zijn om meer submicroscopische afwijkingen aan te tonen (direct laagresolutie array-diagnostiek, in één centrum). Beide methoden zijn mogelijk op ongekweekte chorion- of amnioncellen, wat een voordeel is met betrekking tot de uitslagtermijn. Bij de QF-PCR is gewoonlijk na drie tot vijf werkdagen bekend of er sprake is van trisomie 21, trisomie 18, trisomie 13 of een aneuploidie van de geslachtschromosomen. In-

dien de uitslag van de QF-PCR niet afwijkend is, maar er wel sprake is van een verdikte nekplooi (NT \geq 3,5 mm) of één of meer echografische afwijkingen of twee of meer softmarkers, of een combinatie van voorgaande (soms pas bij de 20-wekenecho), dan wordt aan de zwangere en haar partner hoogresolutie array-diagnostiek aangeboden.

Momenteel is er in Nederland geen consensus voor welke specifieke echoafwijkingen en/of softmarkers wel of geen array-diagnostiek aangeboden zou moeten worden. In het algemeen wordt array-diagnostiek aangeboden als er echografisch aanwijzingen zijn voor bijvoorbeeld structurele afwijkingen aan de organen en/of hersenen, bij hydrops foetalis, foetale akinesie, skeletafwijkingen, contracturen en/of intra-uteriene groeivertraging met normale placentaire flows. Een en ander hangt onder andere af van de aan- of afwezigheid van softmarkers. Hiermee worden bevindingen bedoeld zoals een hypoplastisch neusbotje, een verkort femur ($<$ P5), een tricuspidalisregurgitatie, echodense darmen, *single umbilical artery* (SUA), plexus choroideus-cyste, pyelectasie, echogene focus in het hart, verwijde cisterna magna, *clenched hands/adducted thumbs* en/of een *sandal gap*. Een enkele softmarker is meestal geen reden voor prenatale diagnostiek en dus ook niet voor array-diagnostiek. Onder gynaecologen heerst de tendens dat als er een indicatie bestaat voor prenatale diagnostiek op basis van de echobevindingen, er in principe ook een indicatie bestaat voor array-diagnostiek. Slechts in één academisch centrum wordt array-diagnostiek ook verricht als de maternale leeftijd de indicatie is voor de prenatale diagnostiek, waarbij moet worden opgemerkt dat dan een lagere resolutie (0,5 Mb) array wordt gebruikt.

Andere indicaties voor het verrichten van array-diagnostiek in de prenatale setting zijn een eerder kind of een ouder met een klinisch relevante array-afwijking, of dragerschap van een chromosoomtranslocatie of een inversie bij een gezonde ouder.

In de internationale literatuur lijkt een tendens te bestaan om array-diagnostiek in alle zwangerschappen aan te bieden vanwege de hogere kans op het aantonen van relevante submicroscopische chromosomale afwijkingen. Anderen twijfelen hierover in verband met het toegenomen risico op onduidelijke of toevalsbevindingen van 1-2%.¹⁷ In dit verband is het belangrijk voor de clinicus die de test aanvraagt, zich voor-

af te realiseren of de array in de prenatale setting wordt ingezet als diagnostisch middel bij echografische afwijkingen of voor screening van zwangeren zonder een a priori verhoogd risico. Het primaire doel van prenatale diagnostiek is het paar te helpen bij een keuze indien er sprake is van een (mogelijk) afwijkende foetus. De array is bij echoafwijkingen een diagnostisch sterke test, maar de vraag is of de array ook een geschikte screeningstest is in termen van analytische en klinische validiteit en klinische utiliteit.¹⁷

Voorwaarde voor het verrichten van array-diagnostiek in de prenatale setting is dat het DNA van beide ouders beschikbaar is voor de interpretatie van mogelijk causale CNV's. Het al dan niet terugvinden van een CNV bij ouders met een normaal fenotype kan een grote bijdrage leveren aan de interpretatie van de pathogeniciteit. Een goede fenotypische beoordeling van de ouders door een klinisch geneticus is hierbij essentieel. In de meeste klinisch-genetische centra in Nederland worden de ouders voorafgaande aan de prenatale array-diagnostiek deels door de gynaecoloog gecounseld en slechts in een enkel centrum door de klinisch geneticus.

Los van bovenstaande zal in de komende jaren in Nederland de introductie plaatsvinden van de niet-invasieve prenatale tests (NIPT's). Hierbij vindt onderzoek plaats op vrij foetaal DNA van placentaire oorsprong, dat zich in de maternale circulatie bevindt. Momenteel beperkt de introductie van de NIPT in Nederland (per 1 april 2014) zich tot Down-syndroom (trisomie 21) en de twee andere veelvoorkomende aneuploidieën, het Edwards-syndroom (trisomie 18) en het Patau-syndroom (trisomie 13). In onder andere Duitsland en België is de NIPT al beschikbaar en wordt hiervan reeds gebruikgemaakt, ook door Nederlandse vrouwen. Het is niet ondenkbaar dat in de komende jaren ook CNV-analyse beschikbaar komt door middel van NIPT. Technisch is dit mogelijk.¹⁸ De NIPT valt buiten de reikwijdte van dit artikel, maar zal in de toekomst de toepassing van array-diagnostiek bij de zwangere waarschijnlijk veranderen. Het vaststellen van een CNV zonder dat zich bij de foetus reeds echografische afwijkingen zijn vastgesteld, behoort dan tot de mogelijkheden, wat aandacht behoeft in de pretest-counseling.

Postnataal

Een vertraagde ontwikkeling of verstandelijke beperking (mentale retardatie) is de meest voorko-

mende indicatie voor postnatale array-diagnostiek. In de medische literatuur wordt de incidentie van ontwikkelingsachterstand of -beperking zeer wisselend beschreven, variërend van minder dan 1% tot meer dan 8%. In Nederland wordt gesproken van een geboorteprevalentie van 1,5%.¹ Veel kinderartsen zien dan ook regelmatig patiënten met verstandelijke beperking, ook in de diagnostische fase. Het vaststellen van een oorzaak heeft grote betekenis in de medische behandeling. Het stellen van een diagnose betekent soms een indicatie voor presymptomatische screening, geeft houvast voor de follow-up, maakt ander etiologisch onderzoek veelal onnodig, heeft prognostische waarde en geeft duidelijkheid over het herhalingsrisico. Ook blijkt vaak dat financiële ondersteuning, de toegang tot faciliteiten en schoolkeuze vergemakkelijkt worden door het stellen van een diagnose. Uiteraard is de betekenis sterk afhankelijk van de individuele situatie. De NVK-richtlijn 'Mentale retardatie' geeft onderbouwde handvatten voor etiologisch onderzoek bij verstandelijke beperking; de richtlijn is echter in 2005 vastgesteld, waarbij chromosomenonderzoek alleen karyotypering, fluorescentie-in-situ-hybridisatie (FISH) en multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) behelste. Met betrekking tot het chromosomenonderzoek bij verstandelijke beperking is de karyotypering overall in Nederland vervangen door array-analyse. Wanneer bij verstandelijke beperking de (familie)anamnese en het lichamelijk onderzoek geen diagnose opleveren, is array-diagnostiek geïndiceerd volgens de richtlijn van de American Academy of Neurology, de Child Neurology Society, en het American College of Medical Genetics and Genomics.^{3,4,19} Verschillende studies hebben aangetoond dat array-diagnostiek de eerste keuze is, boven karyotypering en FISH-onderzoek, als methode van genoombrede diagnostiek bij verstandelijke beperking.^{3,19} Herkenbare aandoeningen als gevolg van aneuploidieën zoals Down-syndroom (trisomie 21) vormen hierop een uitzondering. De opbrengst van array-diagnostiek bij een verstandelijke beperking is onder andere afhankelijk van de definitie van verstandelijke beperking. De meeste studies rapporteren een opbrengst tussen de 15 en 20%.^{3,19-23} Bij patiënten met een ontwikkelingsachterstand worden zowel de novo CNV's als parentaal overerfde CNV's vaker teruggevonden, wat illustreert dat ook overerfde CNV's pathogeen kunnen zijn.²⁴ Naast verstandelijke beperking vormen congenitale afwijkingen een belangrijke indicatie voor

postnatale array-diagnostiek. In de richtlijncommissie 'Pre- en posttest-counseling bij array-diagnostiek' wordt thans geïnventariseerd welke indicaties in verschillende centra gehanteerd worden en voor welke indicaties in de medische literatuur voldoende basis wordt gevonden.

Afhankelijk van de situatie kunnen onder meer een afwijkende groei, complexe en onverklaarde neuromusculaire klachten, epilepsie, *disorder of sex development* en gedragsproblemen een goede indicatie zijn voor array-diagnostiek. Meerdere congenitale afwijkingen, complexe congenitale afwijkingen en dysmorphieën zijn een indicatie voor array-diagnostiek. In een tweetal studies wordt bij patiënten met meerdere aangeboren afwijkingen overall in 17-20% een pathogene CNV gevonden.^{25,26} De opbrengst is sterk afhankelijk van de patiëntenpopulatie.

Casuïstiek

Onderstaande casuïstiek illustreert enerzijds de absolute additionele diagnostische waarde van de array-diagnostiek ten opzichte van conventionele karyotypering, maar ook hoe omgegaan is met de dilemma's van het vaststellen van onduidelijke bevindingen of toevalsbevindingen. De genoemde array-resultaten zijn weergegeven op basis van Human Genome Build Hg.19/GCRh37. Bij het interpreteren van data van een array is het van groot belang dat men weet welk referentiegenoom gebruikt is om de posities aan te geven; vanaf 2010 is er een 19e versie van het humaan referentiegenoom (Hg. 19, Genome Reference Consortium Human Genome Build 37).

Prenataal

Casus 1

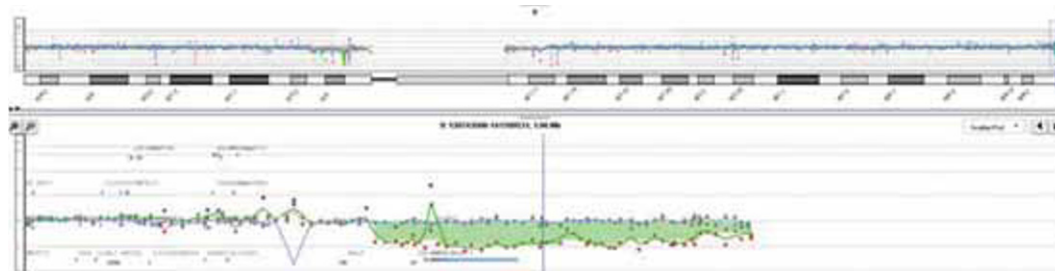
Begin 2013 liet mevrouw A. (38 jaar), die reeds drie gezonde kinderen had, tijdens haar vierde

zwangerschap een combinatie-test verrichten, waarbij een nekplooi van 2,7 mm werd gezien en een risico op Down-syndroom van 1 op 142. Vervolgens werd bij 20 weken een echo verricht en hierbij werd een verdikte nek (*nuchal fold*) van 6,9 mm (normaal: tot 6 mm), polyhydramnion en een hypoplastisch neusbotje vastgesteld. Er werd een vruchtwaterpunctie verricht en met standaardchromosomenonderzoek werd een normaal vrouwelijk chromosomenpatroon vastgesteld (46,XX). De aanwezigheid van één echoafwijking in combinatie met twee softmarkers deed de klinisch geneticus besluiten om array-diagnostiek aan te bieden, alsmede DNA-diagnostiek naar Noonan-syndroom. Door middel van array-CGH (Agilent 180K oligo-array) werd een deletie op de lange arm van chromosoom 9 (arr 9q34.3(140,407,572-141,122,114)X1) vastgesteld, passend bij Kleefstra-syndroom (figuur 3).⁶

Kinderen met dit syndroom hebben een matige tot ernstige verstandelijke beperking, bij 60% is sprake van structurele hersenafwijkingen en tussen de 50 en 60% van deze kinderen vertoont ernstige gedragsproblemen en/of psychiatrische problemen. Ongeveer 40% heeft tevens een hartafwijking. Ook kunnen patiënten met dit syndroom nierafwijkingen hebben, regelmatig infecties, gehoorsproblematiek, problemen met de ademhaling, microcefalie (50%) en een kleine lengte (30%). Bij ruim een derde komt een vorm van epilepsie voor.

Na counseling en zorgvuldige overweging, begeleid door de medisch-maatschappelijk werkende, besloten mevrouw A. en haar partner de zwangerschap bij een termijn van 22 weken en 3 dagen te beëindigen. Bij mevrouw A. en haar partner werd een normaal chromosomenpatroon gezien en met aanvullend FISH-onderzoek kon worden aangetoond dat zij geen van beiden drager zijn van een gebalanceerde chromosoomafwijking

Figuur 3: Array CGH-resultaten van casus 1. Deletie 9q34.3 is zichtbaar (Kleefstra-syndroom). De probes op de nullijn zijn de resultaten bij de ouders. Deze zijn in de afbeelding weergegeven om aan te tonen dat het een de novo casus betreft (de blauwe puntjes zijn van vader, de roze van moeder en de groene van de foetus).



waarbij 9q34.3 betrokken is. Het herhalingsrisico bij een eventuele volgende zwangerschap op dezelfde aandoening is derhalve laag (< 1%).

Casus 2

In 2009 werden tijdens de eerste zwangerschap van mevrouw B. bij 11 weken en 4 dagen een vlokentest verricht in verband met een verdikte nekplooï van 4,4 mm waarbij door middel van conventionele karyotypering een normaal vrouwelijk chromosomenpatroon (46,XX) werd aangetoond. Vanaf 19⁺⁵ weken werden meerdere echografische afwijkingen gezien, zoals een abnormaal ronde caput, een milde symmetrische ventriculomegalie, nekoedeem en laagstaande oren. Tevens werd een hartafwijking waargenomen: de hartas was naar links verplaatst, er was een malalignment-VSD, milde cardiomegalie, rechterventrikeldisfunctie en pericardvocht. Ook werd hydronefrose bij verder normale nieren gezien met een ruime hoeveelheid vruchtwater. Bij aanvullend onderzoek van de uiteinden van de chromosomen (MLPA-subtelomeren) en FISH-onderzoek naar een 22q11-deletie werden geen afwijkingen gevonden. Op basis van bovenstaande congenitale afwijkingen besloot het echtpaar om bij een termijn van 22 weken en 1 dag de zwangerschap te laten beëindigen. Er werd een biopsie van de huidspierfascie afgenomen. Bij de obductie van het hart werd een linkerventrikelhypertrofie, een perimembraneus ventrikelseptumdefect en een subaortale stenose vastgesteld. DNA-diagnostiek naar Noonan-syndroom werd aangevraagd, alsmede aanvullend array-CGH-onderzoek (Agilent 180K oligo-array) op het uit het huidbiopsie geïsoleerde DNA. De diagnose Noonan-syndroom kon met DNA-diagnostiek worden bevestigd: er werd een de novo pathogene mutatie aangetoond in het RAF1-gen (c.770C>T (p.(Ser257Leu))). De array-CGH-diagnostiek bevatte echter een toevalsbevinding die geen relatie had met het fenotype van de foetus, maar mogelijk wel klinisch relevant was voor de ouders. Er werd namelijk in het MSH2-gen een paternale duplicatie van 2p21 (47,484,389-47,570,457) aangetoond, waardoor een mogelijke relatie met HNPCC niet uitgesloten was. Er werd besloten dit in de uitslag te vermelden en het met vader te bespreken. Zijn familieanamnese vermeldde dat zijn maternale oma mogelijk op 68-jarige leeftijd aan darmkanker was overleden en dat de eeneiige tweelingbroer van zijn vader prostaatkanker gehad zou hebben. Verder kwamen er geen personen met

kanker voor in de familie. Meneer had wel een eeneiige tweelingbroer, waardoor ook die direct betrokken werd bij deze materie. Met aanvullende diagnostiek bleek dat de MSH2-duplicatie zo goed als het hele MSH2-gen omvatte, maar niet het promotorgebied in het EPCAM-gen, waardoor het risico dat beide MSH2-genen op het ene chromosoom 2 niet meer zouden werken, als laag werd ingeschat. Verder RNA-onderzoek naar het functioneren van het MSH2-gen bleek helaas niet mogelijk, maar gezien het feit dat het EPCAM-gen niet verdubbeld bleek en er geen verdachte familieanamnese bestond voor HNPCC, werd toch geconcludeerd dat de duplicatie naar alle waarschijnlijkheid een toevallige bevinding was zonder klinische betekenis. Er werd geen aanvullende analyse met FISH verricht om na te gaan of de duplicatie op chromosoom 2p of op een ander chromosoom lag, omdat de grootte van de duplicatie daar te klein voor was (80-130 kb). Wel kreeg meneer het advies om na tien jaar opnieuw contact op te nemen om na te gaan of er dan meer bekend zou zijn rondom deze specifieke duplicatie.

Postnataal

Casus 3

Een 10-jarig meisje werd verwezen naar de polikliniek klinische genetica vanwege een ontwikkelingsachterstand, pubertas praecox en obesitas. De zwangerschap en à terme partus verliepen ongecompliceerd. De spraak-taalontwikkeling was traag op gang gekomen en ze volgde speciaal basisonderwijs. Sinds het eerste jaar is er sprake van overgewicht. Er was sprake van een vroege puberteitsontwikkeling, na aanvullend endocrinologisch onderzoek geduid als idiopathische vroege puberteit. Ze is het eerste kind van niet-consanguïene ouders. De familieanamnese leverde geen relevante gegevens op. Bij lichamelijk onderzoek was sprake van een BMI van 27,2. Er werd geen faciale dysmorfie gezien. Aanvullend onderzoek werd ingezet in de vorm van array-CGH (Agilent 180k oligo-array), metabool onderzoek van urine en plasma en methylering van de Prader-Willi-regio. De array-CGH toonde een duplicatie van Xp11.23p11.22 van circa 5,2 Mb (arr Xp11.23p11.22(47,583,712-52,738,851)x3). De andere onderzoeken waren normaal. FISH-onderzoek naar deze regio toonde bij beide ouders een normaal patroon.

Duplicaties van Xp11.23p11 zijn eerder beschreven door Giorda e.a.²⁷ In dat overzicht worden

drie mannelijke en negen vrouwelijke patiënten beschreven, allen met een ontwikkelingsachterstand, de helft van hen had overgewicht en bij zeven van de negen onderzochte patiënten was sprake van pubertas praecox. In een deel van de beschreven vrouwelijke patiënten bleek het geduplicateerde X-chromosoom preferentieel actief. In de hier beschreven casus werd de X-inactivatie ratio niet bepaald. Daarnaast werden in een deel van de patiënten ook afwijkingen aan de onderste extremiteiten, epilepsie en eeg-afwijkingen beschreven.

Patiënte werd verwezen naar de kinderneuroloog. Een eeg toonde epileptogene activiteit. Behandeling is thans niet geïndiceerd. Al met al lijkt het fenotype goed verklaard te worden door deze array-bevinding. In het algemeen kan de interpretatie van CNV's op het X-chromosoom complex zijn, mede vanwege mogelijke X-inactivatie.

Casus 4

Deze casus illustreert hoe detectie van een deletie met array-diagnostiek kan leiden tot een diagnose van een zeldzame autosomaal recessieve aandoening.

Een 1 jaar oude jongen werd naar de afdeling klinische genetica verwezen vanwege een ernstige ontwikkelingsachterstand, een microcefalie (−4,5 SD) en enkele faciale dysmorphieën (hoge neusbrug, lang filtrum en kleine ogen). Daarnaast had hij een nystagmus, bilaterale pes calcaneovalgus en voedingsproblemen waarvoor sondevoeding. Een MRI-cerebrum toonde een vertraagde myelinisatie. Karyotypering en metabool onderzoek lieten geen afwijkingen zien. Op de leeftijd van 1 jaar en 10 maanden overleed patiënt na een status epilepticus.

Toen bijna tien jaar later array-diagnostiek beschikbaar kwam werd array-CGH-onderzoek gedaan op bewaard DNA. Hiermee werd een grote roq-deletie met een grootte van 6 Mb (arr 10q11.21q11.23 (45,641,802-51,478,672)x1) gevonden. Tot grote verrassing werd dezelfde deletie ook aangetoond bij de gezonde moeder. In het deletiegebied liggen veel genen, waaronder het ERCC6-gen. Dit gen is betrokken bij een zeldzaam autosomaal recessief neurodegeneratief syndroom: het *cerebro-oculo-facio-skeletal*-syndroom (COFS). Kenmerken van het COFS-syndroom zijn onder andere microcefalie en een ernstige ontwikkelingsachterstand, kenmerken die ook aanwezig waren bij onze patiënt. Aanvullend DNA-onderzoek van het ERCC6-gen werd aangevraagd, dit toonde een pathogene nonsense puntmutatie

(c.2569C>T (p.(Arg857*))) in het ERCC6-gen op het vaderlijke allel. Op basis van een deletie op het ene allel in combinatie met een mutatie in het gen gelegen op het andere allel kon uiteindelijk de diagnose COFS-syndroom bevestigd worden.

Casus 5

Een 5-jarig meisje bezocht de polikliniek klinische genetica vanwege bilaterale spasticiteit bij een normale cognitieve ontwikkeling en groei. De zwangerschap en à terme bevalling verliepen ongestoord. De eerste motorische mijlpalen werden op normale leeftijden bereikt. Bij het gaan staan viel een spitsstand van de voeten op, waarvoor evaluatie plaatsvond. De kinderneuroloog stelde bilaterale spasticiteit vast. Een MRI-cerebrum toonde specifieke afwijkingen in de witte stof. Bij het tekenen van de stamboom werd duidelijk dat ouders ver consanguïen zijn. Eerder werd verondersteld dat ouders niet verwant waren. Bij het lichamelijk onderzoek werden geen dysmorphieën gezien. Eerdere diagnostiek in de vorm van DNA-onderzoek van een drietal genen die betrokken kunnen zijn bij hereditaire spastische paraparese (HSP) en array-CGH liet geen afwijkingen zien. Vanwege de consanguïniteit en omdat HSP door mutaties in zeer veel genen veroorzaakt kan worden, werd een SNP-array verricht. ROH-analyse toonde enkele ROH-gebieden. Met behulp van de zogenoemde Genomic Oligoarray and SNP array evaluation tool werd duidelijk dat drie genen die HSP kunnen veroorzaken in deze ROH-gebieden lagen.²⁸ DNA-onderzoek toonde een homozygote, zeer waarschijnlijk pathogene missense mutatie in een van deze HSP-genen: het CYP2U1-gen (= SPG49) (c.512G>T p.(Gly171-Val)). CYP2U1 was juist daarvoor voor het eerst beschreven als HSP-gen.²⁹

Casus 6

Deze casus illustreert dat met array-diagnostiek wel informatie over veranderingen in de kopie-aantallen, maar geen informatie over de lokalisatie daarvan kan worden verkregen.

Een jongen met milde ontwikkelingsachterstand werd verwezen naar het team diagnostiek ontwikkelingsachterstand. Genoombrede diagnostiek in de vorm van array-CGH werd aangevraagd en toonde een gebied met verhoogde ratio op de korte arm van chromosoom X (Xp21.1). Het betreffende gebied had een grootte van slechts 253 kb en werd bij moeder teruggevonden. Omdat vrouwen twee X-chromosomen

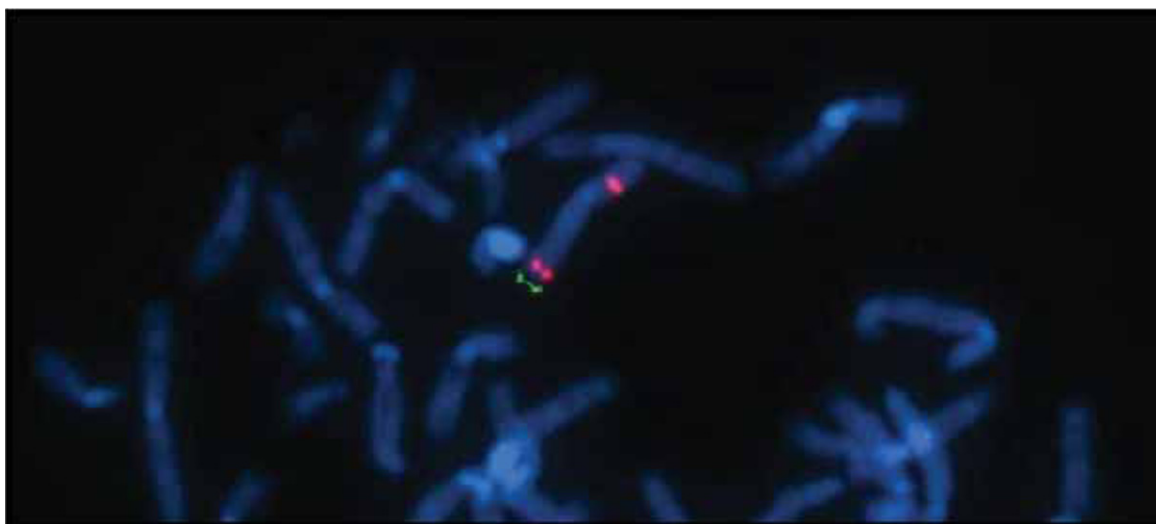
hebben sluit dat een relatie met de ontwikkelingsachterstand bij de jongen niet uit. Bij moeder kan immers het normale X-chromosoom compenseren voor het X-chromosoom met de verandering. Het gebied met verhoogde ratio (duplicatie) bevond zich in het DMD-gen. Bekend is dat mutaties van dit gen leiden tot Duchenne-spierdystrofie. DNA-onderzoek in Leiden bevestigde dat er sprake was van het te veel aanwezig zijn van de exonen 45-50 van het DMD-gen. Een dergelijke duplicatie in het DMD-gen zou zeker de ziekte van Duchenne geven. Echter, de jongen had geen klinische verschijnselen van spierdystrofie en zijn creatininekinase was niet verhoogd, zoals dat bij Duchenne gezien wordt. Aanvullend FISH-onderzoek bracht de verklaring: het stukje chromosoom X dat te veel aanwezig was, bevond zich niet in het DMD-gen, maar op een heel andere plek in het X-chromosoom, namelijk in band Xq27 (figuur 4). Het DMD-gen was bij deze jongen dus niet afwijkend. De ontwikkelingsachterstand wordt mogelijk verklaard door een verstoring van een gen in Xq27 waar het extra materiaal zich bevindt.

Conclusie

Array-diagnostiek heeft het mogelijk gemaakt om de breukpunten van cytogenetisch zichtbare onbalansen nauwkeurig te bepalen en om submicroscopische chromosomale afwijkingen vast

te stellen die voorheen met de standaardkaryotypering onopgemerkt bleven. Hierdoor is het mogelijk geworden bij een additionele 12-15% van de kinderen met aangeboren afwijkingen, ontwikkelingsachterstand, psychische en/of gedragsproblemen een diagnose te stellen, inzicht te geven in de prognose en soms ook handvaten te bieden voor de behandeling. Ook prenaal kent de array-diagnostiek haar meerwaarde in 6% van de casus met echografische afwijkingen, waarbij met conventionele karyotypering geen afwijkingen werden aangetoond. Een ander aspect van array-diagnostiek is dat naast zekere pathogene bevindingen die het fenotype van de patiënt of foetus verklaren, er toevallsbevindingen naar voren kunnen komen waarnaar men niet op zoek was en die geen verklaring vormen voor het fenotype. Daarnaast is de pathogeniciteit van de aangetoonde deleties of duplicaties niet altijd duidelijk, of kan er sprake zijn van een verminderde penetrantie, wat met name in de prenatale setting tot een ingewikkelde situatie kan leiden en de beslissing wel of niet een zwangerschap te behouden vaak bemoeilijkt. Het is daarom van groot belang dat tijdens de pre- en posttest-counseling aandacht is voor deze mogelijke uitslagen, zowel in de prenatale als de postnatale setting. De richtlijn 'Pre- en posttest-counseling bij array-diagnostiek' die in 2014 door de VKGN, NVK en NVOG zal worden afgerond, heeft tot doel een hulp-

Figuur 4: FISH DMD-gen/Xq28. Het rode signaal is een deel van het DMD-gen (FISH-probe RP11-213G12). Het groene signaal markeert Xq28 (FISH-probe RP11-479B17). Een extra kopie van een deel van het DMD-gen dat op Xp21 ligt, bevindt zich in Xq27.



middel te zijn voor iedere clinicus die array-diagnostiek aanvraagt.

Met dit artikel hebben wij een overzicht willen geven van de huidige mogelijkheden en de beperkingen van array-diagnostiek, waarbij een onderscheid is gemaakt tussen de array-CGH en de SNP-array (waarbij onder andere ook ROH-analyse mogelijk is). De pre- en postnatale casus illustreren de waarde en complexiteit van array-diagnostiek. Het verdient aanbeveling dat eenieder die array-diagnostiek aanvraagt, zich te allen tijde bewust is van de mogelijkheden, maar ook van de beperkingen die array-diagnostiek met zich meedraagt en dat deze zaken met de betrokkenen besproken dienen te worden.

Bij andere, nieuwere technieken van genetisch onderzoek, zoals *whole-exome sequencing* en *whole-genome sequencing*, waarbij genoombreed veel gedetailleerde genetische informatie kan worden verkregen, zullen vergelijkbare dilemma's spelen.

Dankwoord

Met dank aan dr. E. Pajkrt en dr. A.B.C. Coumans, gynaecologen in het AMC en het

Summary

Chromosomal microarray enables identifying small genomic deletions and duplications that are not routinely seen on karyotyping. Microarray analysis therefore has emerged as a primary diagnostic tool for the evaluation of developmental delay and structural malformations in children in the Netherlands since 2008. When invasive prenatal diagnosis is indicated, because of ultrasound abnormalities and/or an increased risk for common aneuploidies (trisomy 21, 18 or 13) at first trimester screening, microarray analysis instead of conventional karyotyping will be applied when targeted molecular rapid aneuploidy detection reveals no abnormalities. Microarray analysis provides around 12-15% extra diagnosis in cases of mental retardation and/or structural abnormalities and it can provide 6% extra diagnosis in prenatal samples with a normal karyotype. Besides finding evident causative abnormalities, microarray analysis increases the detection rates of VOUS (variants of unknown significance) that, in particular during a pregnancy, induce emotional burden and counselling difficulties. Furthermore, CNVs that are pathogenic but not related with the phenotype (e.g. deletion of an oncogene) may complicate pretest and posttest counselling as well, since these findings may have health consequences for both patient and family members. Clinicians who request microarray analysis should be aware of these implications. In this paper, two prenatal and four postnatal case reports illustrate the ability to identify more clinically relevant abnormalities, but also limitations and coincidental findings in microarray analysis.

MUMC⁺, voor hun bijdrage aan de beoordeling van de prenatale indicaties; aan dr. M. van Maarle en drs. I.M. Mathijssen, klinisch genetici in het AMC, voor het aanleveren van casuïstiek; aan dr. A. van Essen, klinisch geneticus in het UMCG, voor het aanleveren van casuïstiek; aan dr. T. Dijkhuizen, klinisch moleculair geneticus in het UMCG, en dhr. J. Roozendaal, cytogenetisch analist in het AMC, voor het aanleveren van illustraties.

Auteurs

Mw. dr. P.J.G. Zwijnenburg,* kinderarts, klinisch geneticus, afdeling Klinische Genetica, VUmc, Amsterdam. Mw. dr. P. Lakeman,* klinisch geneticus, afdeling Klinische Genetica, AMC, Amsterdam. Dhr. dr. R. Pfundt, klinisch-genetisch laboratoriumspecialist, afdeling Klinische Genetica, Radboudumc, Nijmegen. Mw. drs. J.S. Klein Wassink-Ruiter, klinisch geneticus, mw. drs. W.S. Kerstjens-Frederikse, klinisch geneticus, en mw. prof.dr. C.M.A. van Ravenswaaij-Arts, klinisch geneticus, afdeling Klinische Genetica, UMCG, Groningen.

* Deze auteurs hebben een gelijke bijdrage geleverd aan de totstandkoming van het manuscript.

Correspondentieadres: dr. P.J.G. Zwijnenburg, afdeling Klinische Genetica, VUmc, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, p.zwijnenburg@vumc.nl.

Literatuur

- 1 Nederlandse Vereniging voor Kindergeneeskunde. Evidence-based richtlijn voor de initiële etiologische diagnostiek bij kinderen met een globale ontwikkelingsachterstand/mentale retardatie. Utrecht: NVK, 2005.
- 2 Gezondheidsraad. Prenatale screening: downsyndroom, neuralebuisdefecten, routine-echoscopie. Den Haag: Gezondheidsraad. 2001.
- 3 Miller DT, Adam MP, Aradhya S, 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.
- 4 Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 2010;12:742-5.
- 5 Wapner RJ, Martin CL, Levy B, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Eng J Med.* 2012;367:2175-84.

- 6 Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J, et al. Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006;79:370-7.
- 7 Koolen DA, Vries BBA de. KANSL1-related intellectual disability syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., eds. *GeneReviews*. University of Seattle, Seattle, 1993.
- 8 Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med.* 2012;367:1321-31.
- 9 Rivera-Brugues N, Albrecht B, Wieczorek D, et al. Cohen syndrome diagnosis using whole genome arrays. *J Med Genet.* 2011;48:136-40.
- 10 Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991;49:995-1013.
- 11 Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, et al. Balanced into array: genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:1152-60.
- 12 Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet.* 2008;82:712-22.
- 13 Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet.* 2010;19:1263-75.
- 14 Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977;29:94-7.
- 15 Claustres M, Kozich V, Dequeker E, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet.* 2013 Aug 14. [Epub ahead of print].
- 16 Dondorp WJ, Wert GM de. The 'thousand-dollar genome': an ethical exploration. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(Suppl 1):S6-26.
- 17 Jong A de, Dondorp WJ, Macville MV, et al. Microarrays as a diagnostic tool in prenatal screening strategies: ethical reflection. *Hum Genet.* 2013 Sep 28. [Epub ahead of print].
- 18 Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010;2:61ra91.
- 19 Michelson DJ, Shevell MI, Sherr EH, et al. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology.* 2011;77:1629-35.
- 20 Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:25-51.
- 21 Tzetis M, Kitsiou-Tzeli S, Frysira H, et al. The clinical utility of molecular karyotyping using high-resolution array-comparative genomic hybridization. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012;12:449-57.
- 22 Taylor MR, Jirikovic J, Wells C, et al. High prevalence of array comparative genomic hybridization abnormalities in adults with unexplained intellectual disability. *Genet Med.* 2010;12:32-8.
- 23 Mannik K, Parkel S, Palta P, et al. A parallel SNP array study of genomic aberrations associated with mental retardation in patients and general population in Estonia. *Eur J Med Genet.* 2011;54:136-43.
- 24 Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, Bon BW van, et al. Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation. *Hum Mutat.* 2013;34:1679-87.
- 25 Lu XY, Phung MT, Shaw CA, et al. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics.* 2008;122:1310-8.
- 26 Ming JE, Geiger E, James AC, et al. Rapid detection of submicroscopic chromosomal rearrangements in children with multiple congenital anomalies using high density oligonucleotide arrays. *Hum Mutat.* 2006;27:467-73.
- 27 Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, et al. Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(X)(p11.22-p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. *Am J Hum Genet.* 2009;85:394-400.
- 28 Wierenga KJ, Jiang Z, Yang AC, et al. A clinical evaluation tool for SNP arrays, especially for autosomal recessive conditions in offspring of consanguineous parents. *Gen Med.* 2013;15:354-60.
- 29 Tesson C, Nawara M, Salih MA, et al. Alteration of fatty-acid-metabolizing enzymes affects mitochondrial form and function in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet.* 2012;91:1051-64.