# Nuovi approcci diagnostici al ritardo mentale

**Elisa Danese[1], Emanuela Meneghelli[1], Fiorenza Aprili[1], Martina Montagnana[1], Orsetta Zuffardi[2], Leonardo Zoccante[3], Bernardo Dalla Bernardina[3], Gian Cesare Guidi[1]**

[1]Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biochimica Clinica, Verona

[2]Dipartimento di Patologia Umana ed Ereditaria, Fondazione IRCCS Mondino, Pavia

[3]Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Neuropsichiatria Infantile, Verona

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 43° Congresso Nazionale SIBioC, 15-18 Novembre 2011, Parma, sotto forma di poster, ricevendo, nella persona del suo primo autore (E. Danese), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.*

## ABSTRACT

**New diagnostic approaches to mental retardation.** Genomic imbalances are considered the most frequent causes of mental retardation (MR). Although widespread screening with novel molecular karyotyping methods, such as multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and array-based comparative genomic hybridization (Array-CGH) might be desirable, effective clinical preselection is essential because of the technical complexities and cost of testing. This study focuses on a retrospective analysis of clinical features in patients with MR of unknown etiology, thereby assessing the sensitivity of a six item checklist in identifying rearranged subjects. The diagnostic powers of single techniques were also evaluated. We studied 164 subjects with MR who had completed the follow diagnostic process: karyotype and eventually fluorescence in situ hybridization (FISH) in case of suspected microdeletion syndrome, specific analysis in case of suspected X-linked or monogenic disease, MLPA for subtelomeric rearrangements in patients negative to previous tests, Array-CGH in patients negative to MLPA. A six items checklist based on relevant clinical signs was retrospectively applied. 5 patients were carrier of chromosomal abnormalities (3 detected by karyotype and 2 by FISH), 3 were affected by X-fragile syndrome, 6 had mutations, and 33 were carriers of genomic imbalances (9 detected by MLPA and 24 by Array-CGH), while 117 resulted negative to any tests. In patients with genomic imbalances and in subjects without rearrangements the median score of the checklist was 6 (range 3-9) and 4 (range 0-8), respectively (P <0,0001). The ROC analysis for the diagnostic accuracy of our checklist showed an area under the curve of 0.74 (95% confidence interval: 0.65-0.83). Using a cut-off for the score of ≥3, 24% of patients could have been excluded without missing any genomic imbalances. This study supports the evidence that the application of a clinical checklist may improve the rate of pathological findings in patients with MR.

## INTRODUZIONE

Il ritardo mentale (RM) costituisce un significativo problema sia dal punto di vista medico che sociale. E' stato stimato che nei paesi occidentali le persone con quoziente intellettivo <70 rappresentino fino al 3% della popolazione (1, 2).

Il paziente con RM rappresenta per il clinico una sfida diagnostica difficile. A fronte, infatti, di un numero di fenotipi relativamente limitato, esiste una molteplicità di possibili cause che concorrono al manifestarsi di questa condizione. Nonostante gli sforzi in campo diagnostico e la collaborazione tra specialisti, in circa il 30%-50% dei pazienti che giungono all'osservazione clinica non è possibile riconoscere un'eziologia chiara (3, 4).

Una volta esclusa l'eziologia organica, per il clinico e il laboratorista inizia la ricerca della possibile causa genetica del disturbo. Fino agli anni '90 le indagini diagnostiche per l'individuazione delle anomalie cromosomiche erano limitate alle tecniche di citogenetica convenzionale (cariotipo e bandeggio ad alta risoluzione) e molecolare ["fluorescence in situ hybridization" (FISH)]. L'avvento di nuove tecniche di genetica molecolare ha rivoluzionato l'approccio diagnostico al paziente con RM o ritardo dello sviluppo (RS), da una parte abbattendo tempi e costi per la diagnosi dei riarrangiamenti subtelomerici, dall'altra focalizzando l'attenzione sui disordini genomici.

Corrispondenza a: Elisa Danese, Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Ospedale Policlinico G.B. Rossi, Piazzale Scuro 10, 37134 Verona. Tel. 0458126698, Fax 0458027484, E-mail elisa.danese@ospedaleuniverona.it

Ricevuto: 19.01.2012 Revisionato: 29.02.2012 Accettato: 14.03.2012

La metodica "multiplex ligation-dependent probe amplification" (MLPA) si basa sulla quantificazione comparativa di sonde che si legano in maniera specifica al DNA genomico e che vengono amplificate mediante una reazione di "polymerase chain reaction" (PCR) che utilizza "primers" universali. Introdotta nel 2003 da un'azienda olandese (MRC-Holland), la MLPA viene utilizzata per la determinazione del dosaggio genico, cioè per misurare il numero di copie di un prodotto genico e quindi per identificare delezioni o duplicazioni criptiche (5). Nell'ambito dei disordini costituzionali, questa tecnica è stata utilizzata da molti autori per lo screening dei riarrangiamenti subtelomerici nei pazienti affetti da RM/RS e ha recentemente sostituito lo stesso esame eseguito mediante tecnica FISH in molti laboratori (6-8).

La tecnica "array-based comparative genomic hybridization" (Array-CGH) permette un'analisi completa e accurata delle variazioni del numero di copie delle sequenze di DNA nell'intero genoma e consente di valutare contemporaneamente e con alta specificità più regioni cromosomiche consentendo l'identificazione di riarrangiamenti inter- e intracromosomici, regioni di amplificazione genica e delezioni (9). Rappresenta, a oggi, la tecnica più sensibile per la diagnosi di disordini genomici avendo una risoluzione 100 volte maggiore rispetto a quella del cariotipo convenzionale (10).

Il primo obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione dell'incidenza dei difetti genetici attualmente diagnosticabili, in una coorte di pazienti affetti da RM/RS. Il secondo obiettivo è stata la valutazione della capacità diagnostica delle singole tecniche citogenetiche e molecolari per gli sbilanciamenti cromosomici. Terzo obiettivo è stata l'individuazione di eventuali differenze nella prevalenza della patologia cromosomica tra pazienti con quadro clinico di diversa gravità. Infine, ultimo obiettivo è stato quello di valutare l'applicazione di una "checklist" basata su segni clinici suggestivi di difetti cromosomici nella selezione dei pazienti da sottoporre a screening per disordini genomici.

## MATERIALI E METODI

### Soggetti

Per questo lavoro sono stati selezionati 164 pazienti con RM/RS (68 femmine e 96 maschi; età media: 7 anni, DS: 4) riferiti alla Sezione di Genetica Medica del Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche tra gennaio 2009 e gennaio 2010 per lo studio del cariotipo in citogenetica costituzionale. Dalla selezione sono stati esclusi i pazienti con diagnosi di aneuploidia cromosomica (Trisomia 21, 13 e 18, sindrome di Turner, sindrome di Klinefelter), autismo e con esami biochimici positivi per disordini metabolici. Inoltre, sono stati esclusi dallo studio i pazienti nei quali, successivamente alle indagini genetiche, la causa del disturbo mentale fosse stata definita come organica e i pazienti per i quali l'iter diagnostico fosse stato sospeso nonostante il mancato riscontro dell'origine eziologica del RM. 80% dei pazienti inclusi proveniva dalle sezioni di Neuropsichiatria Infantile e di Pediatria afferenti al Dipartimento Materno-Infantile e di Biologia-Genetica dell'Università di Verona; il restante 20% dai Nidi o dalle Cliniche Pediatriche di altri ospedali della provincia di Verona.

Per l'esecuzione degli esami genetici è stato raccolto, per ciascun paziente, il consenso informato firmato dai genitori.

### Tecniche diagnostiche

L'iter diagnostico è stato il seguente: tutti i pazienti sono stati sottoposti a esame del cariotipo e, qualora negativo, a screening per i riarrangiamenti subtelomerici mediante tecnica MLPA [SALSA P036 e P070 (MRC-Holland) e a test per sindrome del X-Fragile. L'esame FISH (Vysis Inc.) per sospetta sindrome da microdelezione è stato richiesto ed eseguito per 31 pazienti. Nei casi di sospetta malattia monogenica (27 casi), i campioni dei pazienti sono stati spediti in centri specializzati per l'esecuzione di esami genetici appropriati (metodi non riportati in questo lavoro). Infine, i pazienti risultati negativi a tutte le indagini precedenti sono stati studiati mediante tecnica Array-CGH a una risoluzione minima di 60Kb (Kit 4x180K e Kit 105K Agilent Technologies).

A eccezione dell'Array-CGH (eseguito nel 90% dei casi dal Laboratorio di Citogenetica Molecolare di Pavia) e delle indagini per malattie monogeniche, tutte le indagini genetiche sono state eseguite dal Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche di Verona nei Servizi di Citogenetica e di Biologia Molecolare. I protocolli utilizzati per le diverse metodiche sono stati precedentemente riportati (7).

### "Checklist"

La "checklist" dei segni clinici scelti per questo studio è riportata nella Tabella 1. I criteri di scelta per la creazione della "checklist" sono gli stessi utilizzati da de Vries et al. (11, 12) per la selezione dei pazienti da sottoporre a screening dei riarrangiamenti subtelomerici o ad Array-CGH e comprendono tutti i segni clinici indicativi di sbilanciamenti cromosomici in generale. Diversamente da questi autori, la cui "checklist" prevede al massimo 10 punti, nella "checklist" di questo studio sono stati inseriti dei punteggi anche per il grado di RM/RS (punteggio massimo: 12 punti).

### Analisi statistica

Il confronto tra i gruppi è stato eseguito mediante i test non parametrici di Mann-Whitney, Kruskall-Wallis e test del chi-quadro, mentre la correlazione tra le diverse variabili è stata valutata mediante il test di Spearman. Il livello di significatività statistica scelto è stato $P < 0,05$. L'analisi delle curve ROC ha permesso di individuare i migliori cut-off di punteggio della "checklist" sia in particolare per i riarrangiamenti subtelomerici, che in generale per i disordini genomici. Per determinare la capacità diagnostica di ciascun segno clinico è stata

**Tabella 1**
*Segni clinici e relativi punteggi utilizzati per la creazione della "checklist"*

| Segno | Punteggio |
|---|---|
| Grado di ritardo mentale (RM) | |
| • Lieve | 0 |
| • Moderato | 1 |
| • Grave | 2 |
| Storia familiare di RM | |
| • Compatibile con eredità mendeliana | 1 |
| • Incompatibile con eredità mendeliana | 2 |
| Ritardo di crescita a esordio prenatale | 2 |
| Difetti di crescita in epoca postnatale [1 punto (max 2) per ognuno dei seguenti] | 2 |
| • microcefalia (1), bassa statura (1) (≤2 DS) | |
| • macrocefalia (1), alta statura (1) (≥2 DS) | |
| Dismorfismi facciali ≥2 | 2 |
| Anomalie congenite e dismorfismi non facciali [1 punto (max 2) per ogni anomalia] | 2 |
| Punteggio massimo totale | 12 |

eseguita una regressione multipla. Le analisi sono state eseguite usando i programmi Graphpad Prism (Graphpad Software Inc.) e SPSS versione 14.0 (SPSS Inc.).

## RISULTATI

### Capacità diagnostica dei singoli esami

Lo studio dei 164 pazienti riferiti per RM/RS ha permesso di individuare una causa genetica in 47 casi (28,6%). Il diagramma di flusso seguito è riportato nella Figura 1. Le capacità diagnostiche dei singoli esami erano le seguenti: cariotipo convenzionale 1,8% (3/164), FISH 6,4% (2/31), test molecolari per sospetta sindrome monogenica 22,2% (6/27), X-Fragile 2% (3/153), MLPA 6% (9/150), Array-CGH 17% (24/141). Altre 11 aberrazioni riscontrate mediante tecnica MLPA o Array-CGH sono state classificate come benigne in quanto presenti nel "database" delle varianti genomiche (http://projects.tcag.ca/variation/) o ereditate da uno dei due genitori.

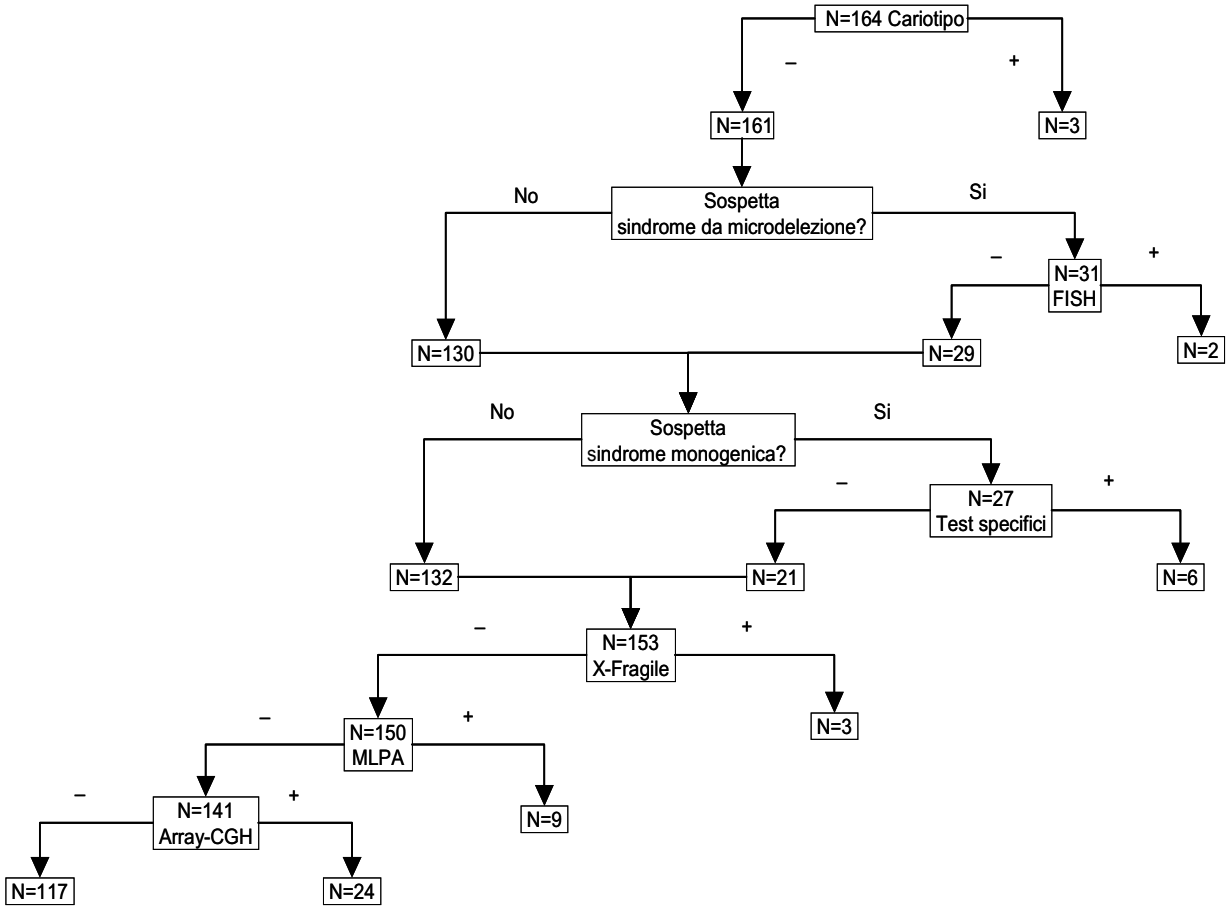



**Figura 1**
*Diagramma di flusso seguito in questo studio per il raggiungimento di una diagnosi genetica.*
*–, esame negativo; +, esame positivo; FISH, fluorescence in situ hybridization; MPLA, multiplex ligation-dependent probe amplification; Array-CGH, array-based comparative genomic hybridization.*

## Valutazione della "checklist"

Una diagnosi genetica è stata raggiunta nel 11,8% dei pazienti con punteggio alla "checklist" uguale a 1 (2/17), nel 12,5% dei pazienti con punteggio uguale a 2 (2/16), nel 22,7% dei pazienti con punteggio uguale a 3 (5/22), nel 23,1% dei pazienti con punteggio di 4 (6/26), nel 29,2% dei pazienti con punteggio di 5 (7/24), nel 41,7% dei pazienti con punteggio di 6 (10/24), nel 50% dei pazienti con punteggio di 7 (7/14) e di 8 (6/12) e nel 100% dei pazienti con punteggi di 9 (1/1) e 10 (1/1). Nella Figura 2 risulta evidente come all'aumentare del punteggio della "checklist" aumenti proporzionalmente la percentuale relativa dei pazienti con diagnosi positiva per malattia genetica. Ne risulta una buona correlazione (r=0,995, P <0,0001) tra percentuale di pazienti positivi per disordini genetici e punteggio della "checklist". Escludendo da questa analisi i casi risultati positivi per sindrome dell'X fragile e per malattie monogeniche (per i quali i segni della "checklist" non sono indicativi, in quanto specifici per sbilanci cromosomici), la correlazione rimane ancora buona (r=0,975, P <0,0001). A ogni punto in più della "checklist", il rischio di riscontrare sbilanciamenti cromosomici aumenta di circa una volta e mezza ("odds ratio" 1,58; 95% intervallo di confidenza (IC): 1,28-1,95; P <0,0001). Tra tutti i segni clinici considerati nella creazione della "checklist", la presenza di difetti di crescita in epoca prenatale si è mostrata l'indicazione più forte alla presenza di riarrangiamenti cromosomici ("odds ratio" 5,10; 95% IC: 2,10-12,42; P=0,0033).

Riguardo al grado di RM/RS (segno clinico aggiuntivo rispetto alla "checklist" di de Vries), l'analisi di regressione ha mostrato che i pazienti con RM/RS grave hanno un rischio circa due volte maggiore rispetto ai pazienti con RM/RS lieve di essere portatori di disordini cromosomici ("odds ratio" 1,99; 95% IC: 1,26-3,15; p=0,0032).

## Caratteristiche dei disordini genomici

L'analisi delle curve ROC per la capacità diagnostica della "checklist" nei disordini genomici (casi positivi a MLPA e Array-CGH) ha mostrato un'area sotto la curva (AUC) di 0,74 (95% IC: 0,65-0,83). La stessa analisi effettuata per i riarrangiamenti subtelomerici (casi positivi a MLPA) ha mostrato un'AUC di 0,85 (95% IC: 0,76-0,93). L'analisi, effettuata applicando la "checklist" ideata da de Vries et al., ha dato i seguenti risultati: AUC=0,72 (95% IC: 0,65-0,81; P <0,0001) e AUC=0,80 (95% IC: 0,72-0,91; P=0,001), rispettivamente per i disordini genomici e per i riarrangiamenti subtelomerici.

I pazienti positivi per l'analisi MLPA avevano punteggi alla "checklist" più alti sia rispetto ai pazienti negativi (mediana: 6 punti, min-max: 5-9, vs. 4 punti, min-max: 0-8; P=0,0048) che rispetto ai pazienti positivi all'Array-CGH (mediana: 5 punti, min-max: 3-8; P=0,024). Tali differenze tra gruppi sono risultate statisticamente significative (P <0,0001).

Utilizzando come cut-off il punteggio di 3, i livelli di sensibilità e specificità per disordini genomici risultavano rispettivamente pari al 100% (95% IC: 89,4-100,0) e 30,8% (95% IC: 22,7-40,0). Utilizzando questo cut-off sarebbe stato quindi possibile escludere dagli screening per disordini genomici il 24% dei pazienti (36 pazienti su 150) senza perdere alcuna diagnosi. Allo stesso modo, utilizzando un cut-off ≥5 sarebbe stato possibile escludere dallo screening per riarrangiamenti subtelomerici il 55,3% (83/150) dei pazienti senza perdere alcuna diagnosi.

Tra i disordini genomici riscontrati all'Array-CGH le delezioni sono risultate più frequentemente associate a un fenotipo severo rispetto alle duplicazioni (mediana: 6,5 punti, min-max: 4-8 vs. mediana: 4 punti, min-max: 3-6; P=0,0009). La grandezza delle aberrazioni considerate patogenetiche è risultata maggiore rispetto a

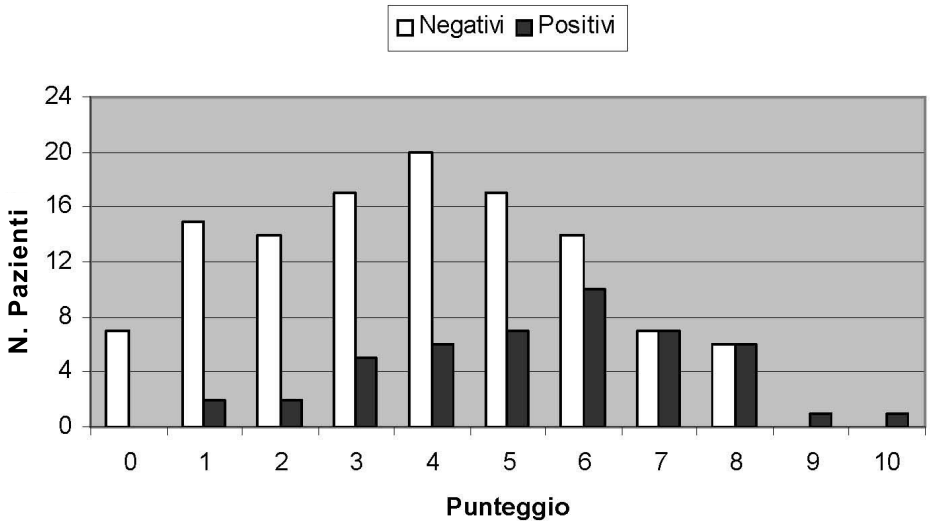



**Figura 2**
*Distribuzione dei pazienti con diagnosi positiva (barre nere) o negativa (barre bianche) ai test genetici in base ai punteggi ottenuti con la "checklist".*

quella delle aberrazioni benigne e tale differenza è risultata statisticamente significativa (mediana: 1,24 Mb, min-max: 0,03-8,60 vs. mediana: 0,27 Mb, min-max: 0,09-1,30; P=0,0046).

## DISCUSSIONE

In questo lavoro sono riportati i risultati delle indagini genetiche eseguite su 164 pazienti affetti da RM/RS idiopatico a presunta eziologia genetica. Il primo approccio diagnostico ha previsto l'analisi del cariotipo ad alta risoluzione secondo le principali raccomandazioni internazionali. L'efficienza diagnostica di questo esame è risultata pari al 1,8%, un dato che, depurato dalle diagnosi di aneuploidie cromosomiche (escluse da questo studio), è in linea con i dati riportati in letteratura (11). Oltre ai 3 casi diagnosticati in citogenetica convenzionale, altre due diagnosi sono state raggiunte mediante applicazione della tecnica FISH con sonde specifiche per le regioni genomiche sospettate di essere interessate dai riarrangiamenti. Al termine di questo esame la percentuale di casi con sbilanci cromosomici è salita dal 1,8 al 3,0%.

L'introduzione della tecnica MLPA, molto sensibile, rapida, accurata e altamente automatizzabile, ha consentito di aumentare l'efficacia diagnostica dei disordini cromosomici del 5,5% passando dal 3,0% di casi diagnosticati al 8,5%. Infine, tale percentuale è salita al 23,2% a seguito dell'applicazione della tecnica Array-CGH. Come già riportato da altri autori, l'Array-CGH a una risoluzione minima di 60 Kb si è rilevata, tra le 4 tecniche utilizzate per l'identificazione di sbilanci cromosomici, la metodica più efficiente in termini di capacità diagnostica (13-17). In futuro, la realizzazione di piattaforme con risoluzioni maggiori consentirà di migliorare ulteriormente le prestazioni di questa metodica (18).

In questo studio, le tecniche Array-CGH e MLPA hanno consentito l'individuazione di anomalie cromosomiche in una percentuale elevata di pazienti affetti da RM/RS con un'effettiva diversità di distribuzione dell'incidenza secondo la gravità del quadro clinico, facendo supporre che la probabilità di un'eziologia cromosomica aumenti con la complessità del fenotipo. Ecco perché, fino a che l'utilizzo di queste tecniche non sarà diffuso a tutti i laboratori diagnostici e i costi per esame resi accessibili anche alle piccole realtà, l'applicazione di una "checklist" basata sulla presenza di segni clinici indicativi di sbilanciamenti cromosomici potrebbe rappresentare uno strumento utile per ridurre il numero di pazienti da studiare e aumentare l'efficienza diagnostica. Nella stessa logica, anche l'individuazione dei pazienti a rischio di riarrangiamenti subtelomerici rappresenta un indubbio vantaggio, dal momento che consentirebbe di fare diagnosi utilizzando un esame poco costoso e rapido (MLPA) riservando l'Array-CGH ai casi più difficili. La "checklist" utilizzata in questo studio ha mostrato buone prestazioni; in particolare, è stata riscontrata una buona correlazione tra i punteggi della "checklist" e la percentuale di pazienti con diagnosi positiva per riarrangiamenti cromosomici. Rispetto alla "checklist" proposta da de Vries, quella utilizzata per questo studio ha previsto l'inclusione del grado di RM/RS. L'aggiunta di questo segno clinico ha migliorato la capacità diagnostica della "checklist", soprattutto nel gruppo di pazienti portatori di riarrangiamenti subtelomerici. Come suggerito da altri autori, essendo i subtelomeri molto ricchi di geni funzionali, delezioni o duplicazioni in queste regioni si accompagnano spesso a fenotipi severi e quindi anche a forme di RM più grave (19).

L'applicazione prospettica della "checklist" alla nostra casistica avrebbe permesso di escludere dalle indagini un numero rilevante di pazienti senza perdere alcuna diagnosi. D'altra parte, si sta sempre più diffondendo il concetto che il cariotipo molecolare dovrebbe, in un futuro prossimo, sostituire il cariotipo convenzionale come tecnica "gold standard" nel primo approccio del paziente affetto da RM (20-25). Un recente studio retrospettivo, condotto su un campione non selezionato di 36.325 soggetti affetti da RM/RS, ha rilevato un'efficienza diagnostica dell'Array-CGH utilizzato come primo esame genetico pari al 19% (10). In una popolazione selezionata, come quella utilizzata in questo studio, l'efficienza diagnostica dell'Array-CGH, utilizzato come primo esame diagnostico, sarebbe stata del 23,2% (38 pazienti su 164).

Nel paziente con RM non specifico, la possibilità di richiedere esami di screening altamente sensibili rappresenta un obiettivo importante che tuttavia non deve prescindere da un'attenta valutazione del fenotipo fisico e comportamentale del soggetto. La sostituzione di metodiche ormai superate con tecniche di screening più sensibili e la contemporanea applicazione di specifiche "checklist" consentono un aumento dei casi diagnosticati e allo stesso tempo una riduzione di esami inutili con indubbi vantaggi in termini di risparmio di risorse umane ed economiche.

## BIBLIOGRAFIA

1. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, et al. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. Res Dev Disabil 2011;32:419-36.
2. Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2002;8:117-34.
3. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. Am J Med Genet 1997;72:468-77.
4. Flint J, Wilkie AO. The genetics of mental retardation. Br Med Bull 1996;52:453-64.
5. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res 2002;30:e57.
6. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, et al. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients

with idiopathic mental retardation. Clin Genet 2006;69:228-33.
7. Danese E, Bernardi F, Meneghelli E, et al. Applicazione della tecnica MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) per lo screening dei riarrangiamenti subtelomerici in pazienti pediatrici con ritardo mentale. RIMeL 2009;6:13-9.
8. Rooms L, Reyniers E, Wuyts W, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification to detect subtelomeric rearrangements in routine diagnostics. Clin Genet 2006;69:58-64.
9. Fan YS, Jayakar P, Zhu H, et al. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. Hum Mutat 2007;28:1124-32.
10. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, 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.
11. De Vries BB, White SM, Knight SJ, et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. J Med Genet 2001;38:145-50.
12. De Vries BB, Pfundt R, Leisink M, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. Am J Hum Genet 2005;77:606-16.
13. Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. Hum Genet 2008;124:1-17.
14. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, 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.
15. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. J Med Genet 2005;42:8-16.
16. Sanlaville D, Lapierre JM, Turleau C, et al. Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. Eur J Med Genet 2005;48:214-31.
17. Bejjani BA, Theisen AP, Ballif BC, et al. Array-based comparative genomic hybridization in clinical diagnosis. Expert Rev Mol Diagn 2005;5:421-9.
18. Shevell M, Ashwal S, Donley D, et al. Practice parameter: evaluation of the child 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 2003;11:367-80.
19. Anderlid BM, Schoumans J, Annerén G, et al. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. Am J Med Genet 2002;107:275-84.
20. Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, et al. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. Hum Mutat 2009;30:283-92.
21. Shevell MI, Bejjani BA, Srour M, et al. Array comparative genomic hybridization in global developmental delay. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2008;147B:1101-8.
22. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and metaanalysis of 19 studies and 13.926 subjects. Genet Med 2009;11:139-46.
23. Salman M, Jhanwar SC, Ostrer H. Will the new cytogenetics replace the old cytogenetics? Clinical Genetics 2004;66:265-75.
24. 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.
25. Park SJ, Jung EH, Ryu RS, et al. Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. Mol Cytogenet 2011;4:12.