



ORIGINAL

Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético: 1.000 casos y análisis de coste-beneficio[☆]



Neus Castells-Sarret^{a,b,*}, Anna M. Cueto-González^{a,c}, Mar Borregan^c,
Fermina López-Grondona^a, Rosa Miró^b, Eduardo Tizzano^{a,d} y Alberto Plaja^{a,b}

^a Àrea de Genètica Clínica i Molecular, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

^c Facultat de Medicina, Departament de Ciències Morfològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España

^d CIBERER, Barcelona, España

Recibido el 5 de abril de 2017; aceptado el 19 de julio de 2017

Disponible en Internet el 27 de septiembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Array de hibridación genómica comparada; Síndrome de microdelección; Discapacidad intelectual; Retraso global del desarrollo; Trastornos del espectro autista; Malformación congénita

Resumen

Fundamento y objetivo: La citogenética convencional detecta un 3-5% de los pacientes con retraso global del desarrollo/discapacidad intelectual y/o malformaciones congénitas. La amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación permite incrementar la tasa diagnóstica entre 2,4-5,8%. Actualmente, los arrays de hibridación genómica comparada o aCGH son la herramienta diagnóstica con mayor rendimiento en estos pacientes, en malformaciones congénitas y trastornos del espectro autista. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la eficiencia del uso del aCGH como técnica de primera línea diagnóstica en estas y otras indicaciones (epilepsia, talla baja).

Pacientes y método: Se ha estudiado a 1.000 pacientes afectados por las patologías mencionadas mediante la técnica de aCGH.

Resultados: Se detectaron desequilibrios de efecto patogénico en un 14% de los pacientes (140/1.000). Según el fenotipo, se diagnosticaron un 18,9% de los pacientes afectados de retraso global del desarrollo/discapacidad intelectual; un 13,7% de las malformaciones congénitas;

[☆] Parte de este trabajo ha sido objeto de parte de la tesis doctoral de Neus Castells Sarret, defendida el 1 de diciembre del 2015 en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona. Título: Array CGH como primera opción en el diagnóstico genético postnatal.

Este trabajo ha sido objeto de una presentación tipo póster en el XXVIII Congreso Nacional de la Asociación Española de Genética Humana (AEGH), 13-15 mayo del 2015. Título: 1.000 estudios de aCGH como técnica de primera línea: la experiencia del Hospital Vall d'Hebron.

Parte de este trabajo ha sido objeto de la publicación del artículo: A novel recurrent breakpoint responsible for rearrangements in the Williams-Beuren region. Cytogenet Genome Res. 2015;146(3):181-186.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ncastellssarret@gmail.com (N. Castells-Sarret).

un 9,76% de las patologías psiquiátricas, un 7,02% de los casos con epilepsia y un 13,3% de los pacientes con talla baja. Dentro de las malformaciones congénitas destacan las del sistema nervioso central con un 14,9% y las cardiopatías congénitas con un 10,6% de diagnósticos. En las patologías psiquiátricas destacan los pacientes con trastornos del espectro autista, con un 8,9% de diagnósticos.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran la efectividad y la eficiencia de la utilización del aCGH como test de primera línea en el diagnóstico genético de los pacientes con sospecha de desequilibrios genómicos. Todo ello avala su inclusión dentro del Sistema Nacional de Salud.

© 2017 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Comparative genomic hybridisation array; Microdeletion syndrome; Intellectual disability; Global developmental delay; Autism spectrum disorders; Congenital malformation

Comparative genomic hybridisation as a first option in genetic diagnosis: 1,000 cases and a cost-benefit analysis

Abstract

Background and objective: Conventional cytogenetics diagnoses 3-5% of patients with unexplained developmental delay/intellectual disability and/or multiple congenital anomalies. The Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification increases diagnostic rates from between 2.4 to 5.8%. Currently the comparative genomic hybridisation array or aCGH is the highest performing diagnostic tool in patients with developmental delay/intellectual disability, congenital anomalies and autism spectrum disorders. Our aim is to evaluate the efficiency of the use of aCGH as first-line test in these and other indications (epilepsy, short stature).

Patients and method: A total of 1000 patients referred due to one or more of the abovementioned disorders were analysed by aCGH.

Results: Pathogenic genomic imbalances were detected in 14% of the cases, with a variable distribution of diagnosis according to the phenotypes: 18.9% of patients with developmental delay/intellectual disability; 13.7% of multiple congenital anomalies, 9.76% of psychiatric pathologies, 7.02% of patients with epilepsy, and 13.3% of patients with short stature. Within the multiple congenital anomalies, central nervous system abnormalities and congenital heart diseases accounted for 14.9% and 10.6% of diagnoses, respectively. Among the psychiatric disorders, patients with autism spectrum disorders accounted for 8.9% of the diagnoses.

Conclusions: Our results demonstrate the effectiveness and efficiency of the use of aCGH as the first line test in genetic diagnosis of patients suspected of genomic imbalances, supporting its inclusion within the National Health System.

© 2017 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Se estima que la prevalencia en la población general del retraso global del desarrollo/discapacidad intelectual (RGD/DI) es de un 1-3%¹, de los trastornos del espectro autista (TEA) del 0,7%² y de las malformaciones congénitas (MC) de un 2-3%¹⁻³, suponiendo un grave problema sanitario y social. El diagnóstico genético de estos pacientes es de gran utilidad en su manejo clínico, permite un pronóstico preciso y, sobre todo, es fundamental para la prevención de la aparición de nuevos casos (asesoramiento genético familiar). Hasta recientemente, el estudio de estos pacientes se ha venido realizando mediante un conjunto de técnicas de laboratorio de bajo rendimiento individual. La técnica más utilizada, el análisis cromosómico convencional o cariotipo, detecta grandes pérdidas o ganancias de material genético y reorganizaciones estructurales en un 3-5% de los pacientes con RGD/DI y/o MC^{1,4-6}. Para mejorar este rendimiento diagnóstico, se complementó la citogenética convencional con las técnicas de hibridación «in

situ» fluorescente (FISH) y amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación (MLPA). Gracias a estas técnicas, en pacientes con RGD/DI y MC con un resultado previo de cariotipo aparentemente normal, se han comunicado un 2,4-3,7% de diagnósticos adicionales con el estudio de las regiones subteloméricas^{7,8} y un 5,8% de diagnósticos adicionales gracias al estudio de los principales síndromes de microdelección o microduplicación⁹.

El reciente desarrollo de los arrays de dosis para la detección de anomalías de copia (de polimorfismos de un solo nucleótido o SNP arrays y de hibridación genómica comparada o aCGH) ha incrementado muy significativamente el número de diagnósticos, permitiendo el diagnóstico de un 15-20% de los pacientes con RGD/DI, MC o TEA⁵. Los arrays de SNP, inicialmente diseñados para interrogar miles de polimorfismos de un nucleótido a lo largo del genoma, también permiten evaluar el número de copias de ADN comparando la intensidad de la hibridación del ADN del paciente con las sondas inmovilizadas en el array o matriz de puntos.

Los aCGH permiten explorar de manera simultánea la dosis de ADN en múltiples loci del genoma al comparar las cantidades relativas de ADN de 2 genomas (control y paciente), marcados con fluorocromos distintos, que se unen con fragmentos de ADN de secuencia conocida o «sondas» que están fijados a un portaobjetos o soporte de vidrio. El color de la fluorescencia en cada punto del aCGH informa sobre la cantidad relativa de cada ADN y permite inferir la presencia de ganancias o de pérdidas en regiones concretas del genoma. Existe un gran número de plataformas de aCGH, con diferencias notables en su rendimiento diagnóstico. Las hay basadas en sondas de bacterial artificial chromosomes (BAC) y en sondas de oligonucleótidos. Las sondas pueden investigar zonas localizadas a intervalos regulares del genoma humano (esqueleto o backbone) o regiones de las que se sabe están relacionadas con patología, o ser una mezcla de las 2¹⁰. El consorcio International Standard Cytogenetic Array (ISCA) proporciona recomendaciones que han sido adoptadas por la mayoría de los fabricantes de arrays. La comparación de las principales plataformas comerciales llevada a cabo en un estudio multicéntrico¹¹ concluyó que los arrays de oligonucleótidos CGH con diseño ISCA y formato 8x60K son los que proporcionan mayor rendimiento coste/beneficio. Debido a consideraciones clínicas y económicas, las guías científicas recomiendan el uso de los arrays como técnica de primera línea diagnóstica en pacientes con DI/RGD, MC y/o TEA, en sustitución de las técnicas de cariotipo, MLPA y FISH^{5,12-16}.

Presentamos nuestra experiencia en el diagnóstico mediante aCGH de 1.000 pacientes con RGD/DI, MC, trastornos psiquiátricos (TEA, TDAH, esquizofrenia, trastorno bipolar), epilepsia, talla baja, y otros (dismorfias, fenotipo peculiar, miopatías, hipercrecimiento) como técnica de primera línea, en sustitución de las técnicas de cariotipo, MLPA y FISH. Se trata de la mayor serie con estas características descrita en nuestro país, ya que hasta ahora se han publicado series de menor tamaño o utilizando los aCGH como técnica de tercera línea, en pacientes con resultado normal en otras técnicas de diagnóstico genético tales como el cariotipo y la MLPA¹⁷.

Pacientes y método

Pacientes

En el periodo de enero del 2012 a enero del 2015 se realizaron 1.222 estudios con la técnica de aCGH en la Unidad de Arrays del Área de Genética Clínica y Molecular del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona. En todos los casos se realizó una visita clínica antes y después del estudio. De ellos, 1.000 corresponden a pacientes con una o más de las siguientes patologías: RGD/DI, MC, trastornos psiquiátricos (TEA, TDAH, esquizofrenia, trastorno bipolar), epilepsia, talla baja y otros como dismorfias, fenotipo peculiar, miopatías e hipercrecimiento, todos ellos sin estudios genéticos previos, derivados por Genética Clínica, Neurología y Endocrinología Pediátrica del hospital. El resto de los estudios corresponden a 4 grupos: 1) estudios familiares (n = 167); 2) fetos con anomalías ecográficas (n = 41); 3) caracterización de anomalías previamente diagnosticadas con otras técnicas, principalmente el cariotipo (n = 4), y 4) pacientes (n = 10) con antecedentes de otros estudios genéticos previos.

Método

Para conocer la tasa de diagnósticos en relación con las alteraciones fenotípicas, se procedió a la exhaustiva revisión de las historias clínicas de todos los pacientes para permitir la correcta interpretación de los estudios de aCGH. Gracias a ello se estableció una clasificación de las patologías y se contabilizó el número de pacientes cuyo fenotipo se ajustaba a cada una de ellas. Los pacientes podían presentar una o más de las patologías de la clasificación (tabla 1).

El ADN de los pacientes se obtuvo a partir de 3 ml de sangre periférica con el Kit Gentra Puregene Blood (Quiagen, EE. UU. n. cat 158422), siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. En unos pocos casos, el ADN había sido extraído por diversos métodos en otros centros o laboratorios hospitalarios.

Tabla 1 Tasa diagnóstica alcanzada con la técnica de aCGH en relación con los distintos fenotipos estudiados. Comparación con datos procedentes de la literatura

| Indicaciones patología | Total pacientes analizados (n = 1.000) | Pacientes con resultado patológico (n = 140) | Diagnósticos (%) | Diagnósticos en la literatura (%) |
|--------------------------|--|--|------------------|-----------------------------------|
| RGD/DI | 406 | 77 | 18,9 | 10-19 ²⁶⁻²⁸ |
| Malformaciones | 394 | 54 | 13,7 | 10-12 ^{5,28} |
| CC | 188 | 20 | 10,6 | 3,6-29 ^{29,30} |
| SNC | 107 | 16 | 14,9 | 14,5-22,5 ^{31,32} |
| Trastornos psiquiátricos | 164 | 16 | 9,75 | |
| TEA | 134 | 12 | 8,9 | 7 ³³ |
| Epilepsia | 57 | 4 | 7,01 | 7,3-20 ³⁴⁻³⁶ |
| Talla baja | 105 | 14 | 13,3 | 10 ¹⁹ |
| Otros | 298 | 36 | 12,08 | |

Trastornos psiquiátricos incluyen: TEA, TDAH, psicosis esquizofrénica, trastorno bipolar. Otros: incluye dismorfias, fenotipos peculiares, miopatías, paresias, hipercrecimiento. Los pacientes presentaban uno o más de los fenotipos descritos.

CC: cardiopatías congénitas; RGD/DI: retraso global del desarrollo/discapacidad intelectual; CC: cardiopatías congénitas; SNC: sistema nervioso central; TDAH: trastorno por déficit de atención e hiperactividad; TEA: trastornos del espectro autista.

Los procedimientos utilizados fueron realizados tras obtención de un consentimiento informado de los padres.

La validación de la técnica de aCGH se efectuó con 2 plataformas distintas de arrays de oligonucleótidos: CGH Microarray Kit 4×180K (Agilent Technologies, EE. UU., n. cat G4426B) con ~180.000 sondas distribuidas de forma aproximadamente equidistante o backbone y CGH Microarray Kit 8×60K diseño ISCA (Agilent Technologies, EE. UU., n. cat G4827A) con menor número de sondas (~60.000), de las cuales 40.208 están distribuidas de forma uniforme (backbone) y 18.851 distribuidas a una mayor densidad y dirigidas a regiones de interés recomendadas por el consorcio ISCA. Se procedió de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Debido a su mayor rendimiento, se decidió realizar todos los estudios de aCGH con la plataforma de 8×60K diseño ISCA. Las imágenes obtenidas con una resolución de 3 micras (DNA microarray scanner, Agilent Technologies, EE. UU., G2505C) se analizaron con el programa Cytogenomics 2.1. (Agilent Technologies, EE. UU.). Para facilitar la evaluación del significado patológico de las anomalías de número de copia (CNV) detectadas y su contenido génico, se utilizó el software de desarrollo propio «EasyArray», escrito en los lenguajes de programación Phyton y VisualBasic. EasyArray compara cada una de las CNV detectadas con los estudios de controles normales incluidos en Database of genome variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) y una base de datos de elaboración propia con los principales síndromes de microdelección/microduplicación, así como si su contenido génico está incluido en la base de datos de enfermedades génicas de UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>). Finalmente, EasyArray facilita la consulta de las bases de datos del consorcio ISCA (<https://www.iscaconsortium.org>), GeneCards (<http://www.genecards.org>), OMIM (<http://www.omim.org>) y Decipher (<https://decipher.sanger.ac.uk>). El programa orienta hacia una clasificación de las CNV como patogénicas, inciertas, o benignas y facilita la redacción de los informes de acuerdo con las recomendaciones del American College of Medical Genetics¹³. A fin de reducir el número de estudios familiares y lograr un equilibrio entre sensibilidad analítica y clínica, no se informan las variaciones de copia de significado incierto de tamaño menor de 400 Kb⁵. Todas las CNV inciertas y patogénicas detectadas se confirmaron mediante FISH, MLPA, cariotipo o un segundo estudio de aCGH.

Se realizó análisis estadístico con el programa SPSS versión 15.0 aplicando el test de la chi al cuadrado para valorar si existía una asociación entre el potencial diagnóstico y el número de alteraciones fenotípicas en un mismo paciente.

Finalmente, a fin de poder comparar la tasa diagnóstica y el coste de las diversas técnicas en nuestra población, todas las anomalías detectadas por aCGH como técnica de primera línea fueron revisadas a fin de determinar si habrían sido detectadas mediante las técnicas de MLPA subtelomérica (P070, MRC Holland, Holanda), MLPA de síndromes recurrentes (P245 y P297, MRC Holland, Holanda) y cariotipo convencional (anomalías de más de 6 Mb)¹⁸ con un cambio de patrón de bandas juzgado como suficiente por un citogenetista experto. Para el análisis del coste por ensayo, se siguieron las directrices del Consenso para la implementación de los arrays en la genética clínica¹⁶.

Resultados

Los resultados de la comparativa entre las 2 plataformas de aCGH (4×180K y 8×60K ISCA v2, ambas de Agilent Technologies) mostraron claramente una mayor especificidad de la plataforma 8×60K ISCA v2 en la detección de CNV patogénicas. Así, por ejemplo, una delección patogénica de 0,043 Mb fue detectada por solo 4 sondas con la plataforma de 4×180K y con 11 sondas utilizando la plataforma 8×60K ISCA v2. En otro caso, una duplicación patogénica afectando a la totalidad del gen *RAF1* se detectó con 10 sondas con la plataforma 4×180K y con 18 sondas con la plataforma 8×60K ISCA v2. Como consecuencia de estos resultados, se decidió utilizar la plataforma 8×60K ISCA v2 detectándose desequilibrios de efecto patogénico en un 14% de los pacientes (140/1.000), en 17 casos se detectó más de una CNV patogénica. Se detectaron desequilibrios de significado incierto de más de 400 Kb (variants of uncertain significance [VOUS]) en un 6,1% de los pacientes (61/1.000).

Se detectaron anomalías de copia patogénicas en un 18,9% de los pacientes afectados de RGD/DI (77/406), un 13,7% de las MC (54/394), un 9,76% de las patologías psiquiátricas (16/164), un 7,02% de los casos con epilepsia (4/57) y un 13,3% de los casos remitidos por talla baja (14/105). El rendimiento diagnóstico fue del 12,08% (36/298) para las diversas patologías clasificadas en la categoría «otros» (incluyendo dismorfias, fenotipos peculiares, miopatías, paresias, hipercrecimiento). Dentro de las MC destacan las anomalías del sistema nervioso central, con un 14,9% de diagnósticos (16/107), y las cardiopatías congénitas, con un 10,6% de diagnósticos (20/188). En el grupo de las patologías psiquiátricas, destacan los pacientes con TEA, con un 8,9% (12/134) de diagnósticos (tabla 1).

Al agrupar los pacientes en función del número de anomalías fenotípicas que presentaban, se observó que la tasa diagnóstica se incrementaba de forma estadísticamente significativa ($p = 0,0223$) en los pacientes con un mayor número de anomalías fenotípicas (tabla 2).

En nuestra serie se han detectado microdelecciones y microduplicaciones en mosaico, como, por ejemplo, una delección 1p36 de 12.6 Mb en un paciente con cardiopatía, confirmada mediante técnicas de FISH en un 9,8% de las células de un cultivo de sangre; una duplicación 1q21.1-q32.1 de 61,38 Mb en un paciente con epilepsia confirmada por cariotipo y FISH en un 1,2% de las metafases y una delección intersticial 18q21.31-q22.2 de 14,6 Mb en un paciente con RGD, no detectada por el programa, pero sí presente en el gráfico que proporciona el mismo y que se contabilizó en un 43,3% de las metafases analizadas (fig. 1).

Finalmente, tras revisar a los 140 pacientes cuyas anomalías fueron detectadas con aCGH, se concluyó que 43 (30,7%) habrían sido detectadas también por otras técnicas: 6 (4,2%) mediante cariotipo convencional, 6 (4,3%) mediante cariotipo y MLPA, y, finalmente, 31 (22,1%) mediante MLPA.

Discusión

Este trabajo presenta la mayor serie de estudios de aCGH como primera elección en pacientes con diversas patologías descritas en nuestro país, ya que hasta ahora se habían publicado series de menor tamaño o utilizando los aCGH como

Tabla 2 Porcentaje de diagnósticos mediante la técnica de aCGH en función del número de anomalías fenotípicas presentes

| N.º de anomalías fenotípicas registradas en la historia clínica | Total pacientes analizados (n = 1.000) | Pacientes con resultado de aCGH patológico (n = 140) | Diagnósticos (%) |
|---|--|--|------------------|
| > 2 | 68 | 15 | 20 |
| 2 | 288 | 48 | 16,6 |
| 1 | 644 | 77 | 11,9 |

Las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas (p = 0,0223).

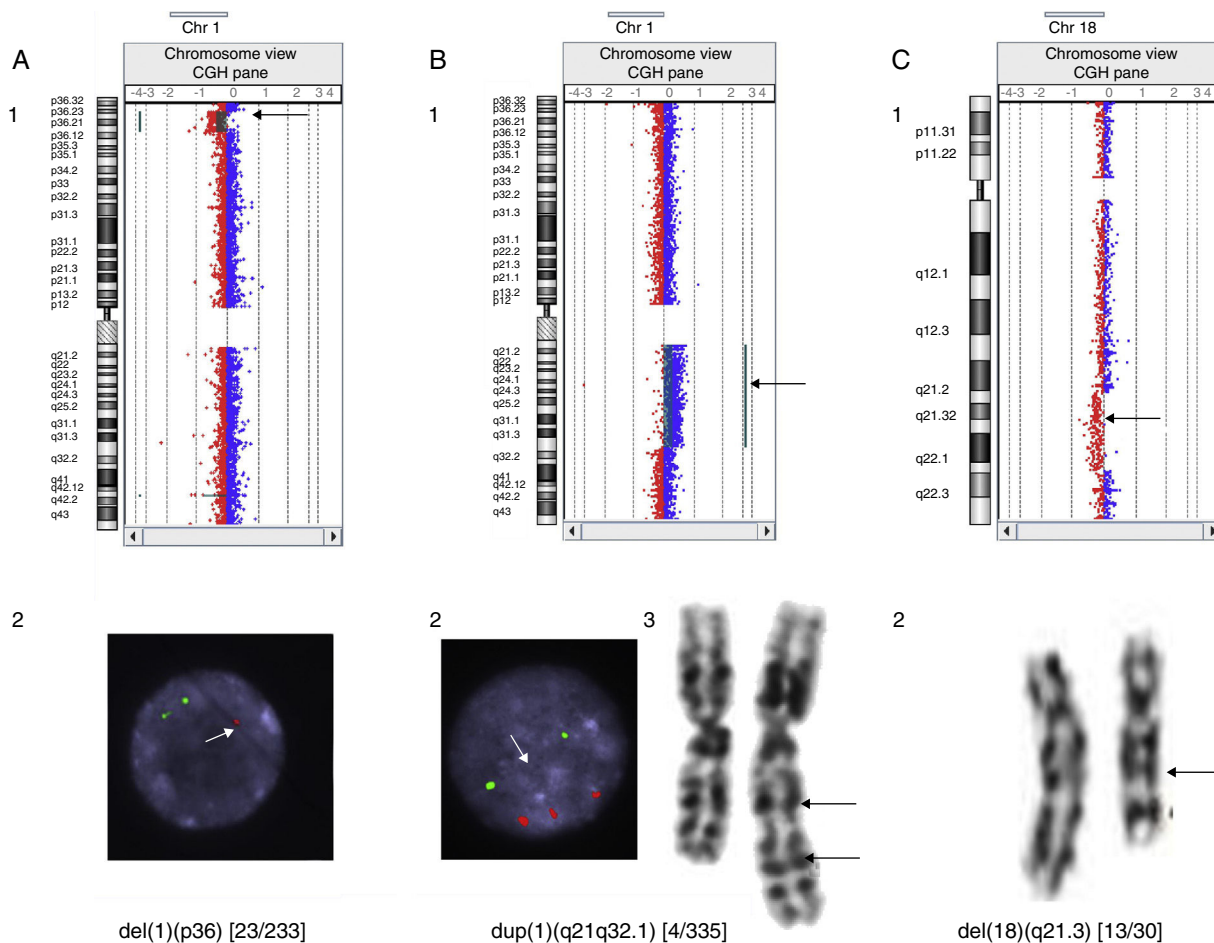


Figura 1 Casos de mosaicismos detectados por hibridación genómica comparada. A) Deleción 1p36 en mosaico en un paciente con cardiopatía: detectada mediante aCGH (1) y confirmada en un 9,8% de las células analizadas por FISH. Solo una única señal en el núcleo de la fotografía, indicada por la flecha, corresponde a la región 1p36 (2). B) Duplicación 1q21.1-q32.1 en un paciente con epilepsia: detectada mediante aCGH (1), confirmada en un 1,2% de las células analizadas por FISH. Las tres señales inferiores del núcleo de la fotografía, a las que se dirige la flecha, corresponden a la región 1q21q32.1 (2) y cariotipo (3). C) Deleción 18q21.31-q22.2 en un paciente con RGD: detectada mediante aCGH(1) y confirmada en un 43,3% de las células analizadas por cariotipo (2).

técnica de tercera línea, en pacientes con resultado normal en otras técnicas de diagnóstico genético, tales como el cariotipo y la MLPA¹⁷.

Con un 14% de pacientes con anomalías detectadas (tabla 1), nuestros resultados confirman que actualmente el aCGH es la técnica individual con un mayor rendimiento diagnóstico en los pacientes con RGD/DI, MC y TEA⁵. El rendimiento diagnóstico no es uniforme y varía mucho en función del tipo y el número de anomalías fenotípicas que se

observan en los pacientes (tablas 1 y 2), coincidiendo nuestros resultados con los estudios publicados por otros autores (referencias en la tabla 1).

Las indicaciones clásicas del estudio de aCGH incluyen RGD/DI, TEA y MC⁵, con unas tasas diagnósticas del 18,9, el 14,8 y el 13,7%, respectivamente. Nuestros resultados y los de otros autores¹⁹ indican la conveniencia de incluir la talla baja como nueva indicación del estudio del aCGH, ya que se ha detectado aproximadamente un 13,3% (14/105) de

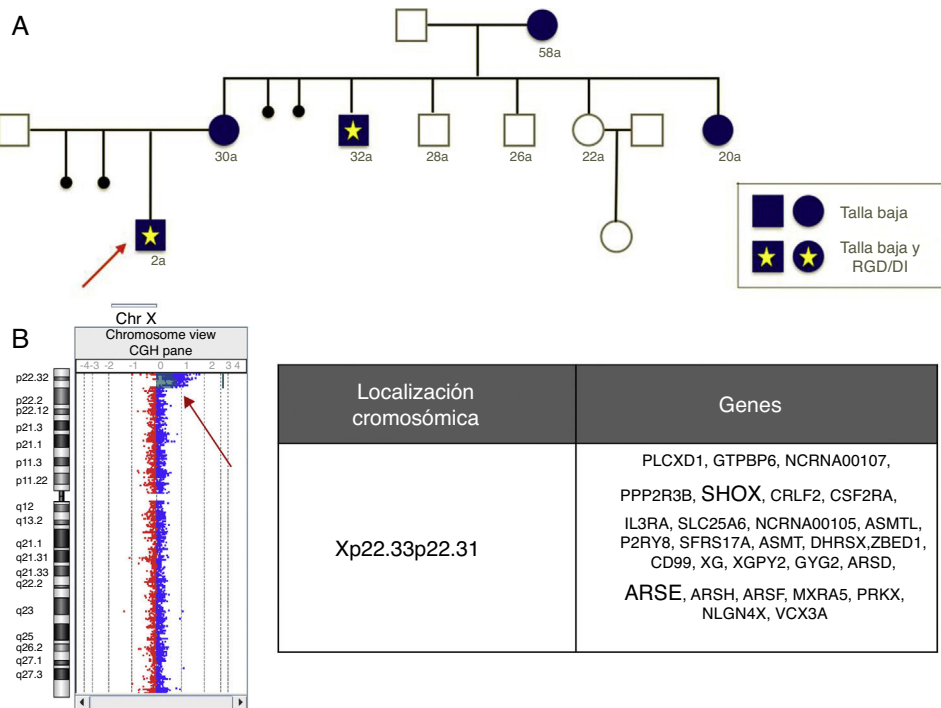


Figura 2 A) Pedigrí de una familia portadora de una deleción Xp22.33-p22.31. B) Resultado del análisis mediante aCGH, que implica la pérdida de los genes *SHOX* y *ARSE*, principales responsables de las alteraciones fenotípicas.

anomalías, de las cuales solo un 21,42% (3/14) afectan al gen *SHOX*. Nuestros resultados también señalan la conveniencia de incluir como indicación del estudio de aCGH las epilepsias aisladas, sin malformaciones del sistema nervioso central, con un 7% de diagnósticos.

Como beneficio adicional, los estudios de aCGH permiten una caracterización de las anomalías más precisa que la FISH o la MLPA comercial, a veces con implicaciones de asesoramiento reproductivo importantes, por ejemplo, la figura 2 muestra una deleción que incluye el gen *SHOX* y otros genes no pseudoautosómicos, como el *ARSE*, en portadoras con talla baja y varones afectados de un fenotipo mucho más grave incluyendo talla baja, condrodisplasia punctata y RGD/DI.

Los aCGH permiten el diagnóstico de síndromes de microdeleción con puntos de rotura atípicos que pueden ser invisibles por FISH, el método diagnóstico más extendido. En particular, nuestra serie ha permitido detectar un nuevo punto de rotura recurrente en la región crítica del síndrome de Williams que en los casos de deleción permite la hibridación parcial de las sondas de FISH comerciales más utilizadas, produciendo falsos negativos²⁰.

Los aCGH detectan las ganancias y las pérdidas de material genómico con mucha más precisión que el cariotipo, pero son incapaces de detectar las anomalías equilibradas (principalmente translocaciones e inversiones) que en algún caso pueden ser causa de patología. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas representan solamente una muy pequeña proporción de las alteraciones clínicamente relevantes^{5,21}.

Los estudios de aCGH indican la presencia de un mosaicismo cuando se observan valores intermedios de fluorescencia, si bien es difícil deducir el grado del mismo. En este sentido, nuestros resultados han sido dispares, ya que

mientras se diagnosticaron fácilmente anomalías que solo se observaron en un 9,8 y un 1,2% de metafases analizadas (fig. 1 A y B), mosaicos observados en más de un 40% de las metafases provocaron cambios de fluorescencia tan sutiles que no fueron detectados por el programa de análisis Cytogenomics, aunque sí se visualizaban en el gráfico proporcionado por el mismo (fig. 1 C). Una posible explicación es que las diversas técnicas analizan poblaciones celulares diferentes: linfocitos T procedentes de cultivos celulares estimulados con fitohemaglutinina en los estudios de cariotipo/FISH y todas las células sanguíneas nucleadas en los aCGH.

La diferencia entre la tasa diagnóstica en función de las diversas indicaciones puede justificar la disparidad de los resultados publicados, con tasas diagnósticas tan extremas como el 7,6% de Shen et al.²² y el 35% de Aradhy et al.²³. Ambos estudios analizan el genoma con una resolución similar (35 Kb) pero difieren en la población analizada: poco definida fenotípicamente en el primer estudio y pacientes seleccionados por presentar un fenotipo considerado muy indicativo de tener una anomalía de copia (CNV) en el segundo. Las grandes series publicadas utilizando la técnica de aCGH como primera opción diagnóstica, como por ejemplo las de Ahn et al.²⁴ con 8.300 pacientes y Shaffer et al.⁶ con 8.789 pacientes, aportan la detección de un gran número de CNV patogénicas pero detallan poco el fenotipo de las mismas. Por otro lado, las series de pacientes bien caracterizadas fenotípicamente frecuentemente son de pequeño tamaño y focalizadas en un tipo concreto de patología, como por ejemplo la de Roselló et al.²⁵, con 246 pacientes con DI. Nuestra serie aporta los resultados del estudio de aCGH como primera opción diagnóstica en 1.000 pacientes con una detallada clasificación fenotípica.

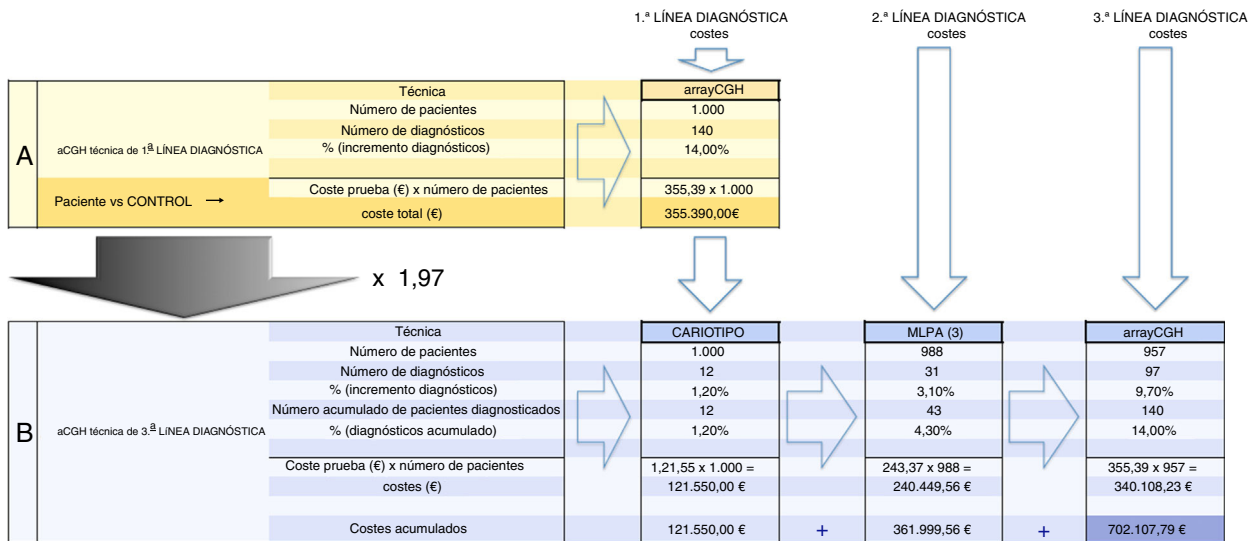


Figura 3 Cálculo de los costes para cada una de las dos estrategias diagnósticas. A: cálculo del coste del uso del aCGH como primera opción diagnóstica. B: cálculo de los costes del uso del aCGH como tercera opción, tras el cariotipo y la MLPA. De los 140 casos diagnosticados mediante aCGH, 12 se hubieran diagnosticado mediante cariotipo (de los cuales 2 eran aneuploidías y 10 desequilibrios de más de 6 Mb); 31 se habrían diagnosticado mediante MLPA con ensayos de anomalías subteloméricas y de síndromes genómicos recurrentes, y los 97 casos restantes se habrían diagnosticado mediante aCGH, después de un resultado normal de cariotipo y MLPA. Costes¹⁶: cariotipo 121,55 €/ensayo; MLPA 243,37 €/3ensayos MLPA; aCGH 355,39 €/ensayo. El enfoque tradicional de cariotipo y MLPA (estrategia B) hubiera conseguido menos de un tercio de los diagnósticos en nuestra población (43/140). Implementar el array para lograr el 100% de los desequilibrios multiplica por 1,97 el coste que supondría aplicar el array como primera y única opción (estrategia A).

En consecuencia, el presente estudio permite contrastar con fiabilidad en términos de efectividad y eficiencia la estrategia del aCGH como primera opción diagnóstica en la detección de desequilibrios genómicos frente a la estrategia estándar de cariotipo, estudio de MLPA y la adición del estudio de aCGH como opción de tercera línea (fig. 2). La comparación de las series publicadas de pacientes estudiados con cariotipo, FISH, MLPA o aCGH es complicada ya que analizan poblaciones diferentes. El presente estudio permite una aproximación basada en una población única, asumiendo que el aCGH detecta la casi totalidad de las anomalías clínicamente relevantes. La estrategia tradicional de estudio de cariotipo y MLPA disponibles para estas patologías (2 kits de trastornos genómicos recurrentes y uno de anomalías subteloméricas) habría diagnosticado solo 43 (30,7%) de los 140 pacientes diagnosticados por aCGH a un coste aproximado de 362.000 € (1.000 cariotipos + 988 MLPA), al que habría que añadir el coste de 957 aCGH para llegar a diagnosticar los 140 pacientes, con un coste global de 702.107 € (fig. 3). El estudio de los mismos pacientes únicamente por aCGH sería de unos 355.390 €. En resumen, el enfoque tradicional de MLPA y cariotipo hubiera logrado menos de un tercio de los diagnósticos en nuestra población, y se alcanzaría la detección del 100% de los desequilibrios detectables por aCGH multiplicando el gasto por 1,97.

Nuestros resultados ilustran la efectividad y la eficiencia de la utilización de los aCGH como primera opción en el diagnóstico genético de los pacientes con RGD/DI, MC, TEA, talla baja y epilepsia. Estos resultados y el análisis coste-beneficio avalan su inclusión dentro del Sistema Nacional de Salud en complementación y sustitución de las técnicas de cariotipo, MLPA y FISH.

La evolución en aCGH es continua y recientemente han aparecido nuevos diseños de array que incluyen sondas backbone y sondas dirigidas según consorcio ISCA, y además garantizan una cobertura a nivel de exón de un número significativo de genes. En este nuevo contexto se necesitan estudios adicionales para reevaluar el coste-beneficio entre las plataformas de aCGH 8x60K y 4x180K.

Financiación

Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente con un proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo de España (PS09/00632).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A los familiares de nuestros pacientes y a nuestros pacientes.

Bibliografía

- Shevell M, Ashwal S, Donley D. 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;60:367-80.

2. Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK, Levy SE, et al. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health.* 2007;28:235–58.
3. Corsello G, Giuffrè M. Congenital malformations. *J Matern Neonatal Med.* 2012;25:25–9.
4. Van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JMN, et al. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: A prospective study. *Am J Ment Retard.* 2005;110:253–67.
5. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86:749–64.
6. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet.* 2007;145C:335–45.
7. Mundhofir FEP, Nillesen WM, van Bon BWM, Smeets D, Pfundt R, van de Ven-Schobers G, et al. Subtelomeric chromosomal rearrangements in a large cohort of unexplained intellectually disabled individuals in Indonesia: A clinical and molecular study. *Indian J Hum Genet.* 2013;19:171–8.
8. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* 2006;43:478–89.
9. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet.* 2007;50:33–42.
10. Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, Bunke BP, Alexander CR, Kogan AL, et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med.* 2008;10:415–29.
11. Huang S, Crolla J. Comparison for cytogenetics array platforms hardware and software for use in identifying copy number aberrations in constitutional disorders. 2010. National Genetics Reference Laboratory (Wessex). NGRW.aCGH.1.0 [consultado Ene 2017]. Disponible en: [http://www.ngrl.org.uk/wessex/downloads/pdf/NGRLW.aCGH.1\[1\].0.pdf](http://www.ngrl.org.uk/wessex/downloads/pdf/NGRLW.aCGH.1[1].0.pdf).
12. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristofferson U, Cavani S. Specific constitutional cytogenetic guidelines. *E.C.A. Newsletter.* 2012;30:11–9.
13. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13:680–5.
14. Park SJ, Jung EH, Ryu RS, Kang HW, Ko JM, Kim HJ, 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.
15. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 2010;12:742–5.
16. Cigudosa JC, Lapunzina P, editores. Consenso para la implementación de los arrays (CGH y SNP-arrays) en la genética clínica. Madrid: Instituto Roche Madrid; 2012.
17. Rodríguez-Revenga L, Vallespín E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, García-Miñaur S, et al. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene.* 2013;521:82–6.
18. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:1105–14.
19. Zahnleiter D, Uebe S, Ekici AB, Hoyer J, Wiesener A, Wiczorek D, et al. Rare copy number variants are a common cause of short stature. *PLoS Genet.* 2013;9:1–11.
20. Plaja A, Castells N, Cueto A, del Campo M, Vendrell T, Lloveras E, et al. A novel recurrent breakpoint responsible for rearrangements in the Williams-Beuren region. *Cytogenet Genome Res.* 2015;146:181–6.
21. 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.
22. Shen Y, Irons M, Miller DT, Sau WC, Lip V, Sheng X, et al. Development of a focused oligonucleotide-array comparative genomic hybridization chip for clinical diagnosis of genomic imbalance. *Clinical Chemistry.* 2007;52:2051–9.
23. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:1431–41.
24. Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals—results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet. Molecular Cytogenetics.* 2013;6:16.
25. Roselló M, Martínez F, Monfort S, Mayo S, Oltra S, Orellana C. Phenotype profiling of patients with intellectual disability and copy number variations. *Eur J Paediatr Neurol.* 2014;8:1–9.
26. Friedman JM, Baross A, Delaney A, Ally A, Arbour L, Asano J, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2006;79:500–13.
27. Siggberg L, Ala-Mello S, Jaakkola E, Kuusinen E, Schuit R, Kohlhase J, et al. Array CGH in molecular diagnosis of mental retardation —A study of 150 Finnish patients. *Am J Med Genet A.* 2010;152:1398–410.
28. Sagoo G, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JPT, Burton H, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med.* 2009;11:140–6.
29. Bachman K, deWard S, Chrysostomou C, Munoz R, Madan-Khetarpal S. Array CGH as a first tier test for neonates with congenital heart disease. *Cardiol Young.* 2013;6:1–8.
30. Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, et al. Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res.* 2011;35:251–9.
31. Kariminejad R, Lind-Thomsen A, Tümer Z, Erdogan F, Ropers HH, Tommerup N, et al. High frequency of rare copy number variants affecting functionally related genes in patients with structural brain malformations. *Hum Mutat.* 2011;32:1427–35.
32. Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, Bunke BP, Alexander CR, Kogan AL, et al. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med.* 2008;10:415–29.
33. Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, et al. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders *Pediatrics.* 2010;25:e727–35.
34. Galizia EC, Srikantha M, Palmer R, Waters JJ, Lench N, Ogilvie CM, et al. Array comparative genomic hybridization: Results from an adult population with drug-resistant epilepsy and comorbidities. *Eur J Med Genet.* 2012;55:342–8.

35. Wincent J, Kolbjørn S, Martin D, Luthman A, Amark P, Per D, et al. Copy number variations in children with brain malformations and refractory epilepsy. *Am J Med Genet A*. 2015;167: 512–23.
36. Lal D, Ruppert AK, Trucks H, Schulz H, de Kovel CG, Kasteleijn-Nolst TD, et al. Burden analysis of rare microdeletion suggests a strong impact of neurodevelopmental genes in genetic generalised epilepsies. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005226.