

# Przydatność metody MLPA do szybkiej prenatalnej identyfikacji aneuploidii. Wyniki 409 badań diagnostycznych

Usefulness of MLPA technique for rapid prenatal detection of aneuploidy.  
Results of 409 diagnostic studies

Bocian Ewa, Kasprzycka Justyna, Jakubów-Durska Krystyna,  
Łuszczek Alicja, Bernaciak Joanna

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka w Warszawie, Polska

## Streszczenie

**Cel pracy:** celem pracy była ocena przydatności metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) do szybkiej diagnostyki prenatalnej aneuploidii chromosomów 13, 18, 21 oraz X i Y.

**Materiał i metody:** 409 próbek płynu owodniowego z amniopunkcji wykonanej w celu oceny kariotypu płodu. DNA komórek płynu owodniowego uzyskiwano z zastosowaniem zestawu Qiamp DNA Blood Midi Kit (348) lub metodą lizy trawienia komórek proteinazą K (61). Do wykrywania aneuploidii stosowano zestaw sond SALSA MLPA P095 (mrc-Holland).

**Wyniki:** Wyniki uzyskano w 324 badaniach (79,2%). Obecność aberracji stwierdzono w 16 przypadkach (4,9%). Wszystkie potwierdzone były w badaniu kariotypu metodą klasyczną. W 3 badaniach (0,92%) uzyskano wyniki fałszywie ujemne. Dotyczyły one aberracji, których metoda MLPA nie wykrywa.

**Wnioski:** Metoda MLPA jest wiarygodną metodą szybkiej prenatalnej diagnostyki najczęstszych aneuploidii.

Słowa kluczowe: **diagnostyka prenatalna / aneuploidia / metoda MLPA /**

## Adres do korespondencji:

Ewa Bocian,  
Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka  
Polska, 01-211 Warszawa, Kasprzaka 17A  
tel/fax: (22) 32 77 131 / (22) 32 77 152  
e-mail: ewa.bocian@imid.med.pl

Otrzymano: 04.06.2011  
Zaakceptowano do druku: 16.08.2011

## Abstract

**Objectives:** The study was aimed to determine diagnostic application of MLPA for rapid prenatal identification of chromosome 13, 18, 21 and X and Y aneuploidies.

**Material and methods:** 409 amniotic fluid samples from amniocentesis for fetal karyotyping were studied. DNA was isolated using the QIAmp DNA Blood Midi Kit (348 samples) or through proteinase K treatment (61 samples). SALSA MLPA P095 probes (mrc-Holland) were used to detect aneuploidy.

**Results:** In 324 studies (79.2%) diagnostic results were obtained. Chromosomal aberrations were found in 16 cases (4.9%). These results were concordant with standard karyotype. In 3 cases (0.92%) false negative results were found but all abnormalities were undetectable with MLPA.

**Conclusions:** MLPA is a reliable method of rapid prenatal detection of aneuploidy.

Key words: **prenatal diagnosis / aneuploidy / MLPA technique /**

## Wprowadzenie

Aneuploidia stanowi 65-85% wszystkich wykrywanych prenatalnie aberracji chromosomowych i odpowiedzialna jest za 80-95% wrodzonych wad rozwojowych stwierdzanych u noworodków [1-3]. Tradycyjnym „złotym standardem” diagnostyki tych aberracji jest ocena kariotypu płodu metodami analizy obrazu prążkowego chromosomów uzyskanych z hodowli komórek płynu owodniowego lub trofoblastu. Podstawową wadą tej metody diagnostycznej jest długi czas badania (10-21 dni), duża pracochłonność oraz wysoki koszt. W testach umożliwiających szybką (w ciągu 1-3 dni) identyfikację aneuploidii stosowane mogą być trzy metody cytogenetyki i biologii molekularnej: FISH (*fluorescence hybridization in situ*), QF-PCR (*quantitative fluorescence polymerase chain reaction*) oraz MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) [4-13].

Metody te mają porównywalną skuteczność i wiarygodność diagnostyczną [14]. Zaletą szeroko obecnie stosowanych metod QF-PCR i MLPA jest możliwość wykonywania większej liczby badań jednocześnie oraz mniejsza pracochłonność i koszt w porównaniu do badań metodą FISH.

Badanie najnowszą, opracowaną w 2002 roku metodą MLPA, podobnie jak metodą QF-PCR prowadzone jest na DNA izolowanym z komórek płodu i nie wymaga ich hodowli ani sporządzania preparatów chromosomowych [15]. MLPA umożliwia ilościową ocenę około 40 różnych sekwencji DNA w jednym badaniu. Polega na hybrydyzacji specyficznej sondy zawierającej dwa wyznaczniki fluorescencyjne nukleotydy, które hybrydują do dwóch sąsiadujących miejsc w specyficznej dla sondy sekwencji badanego DNA. Połączenie zhybrydyzowanych sond umożliwia ich amplifikację w reakcji PCR. Ilościowa ocena produktów PCR w oparciu o ich długość i intensywność fluorescencji umożliwia ocenę liczby kopii badanych sekwencji DNA proporcjonalnej do liczby badanych chromosomów. Istotną zaletą metody MLPA jest możliwość analizy znacznie większej liczby loci w badanych chromosomach niż w przypadku metody QF-PCR i FISH (odpowiednio 8, 4 i 1). Wadą tej metody jest brak możliwości identyfikacji triploidii.

W pracy przedstawiono wyniki 409 prenatalnych badań diagnostycznych wykonanych metodą MLPA w ciążyach ryzyka genetycznego. Oceniono skuteczność i wiarygodność tej metody oraz dokonano krytycznej analizy jej przydatności diagnostycznej w badaniach prenatalnych.

## Cel pracy

Celem pracy była adaptacja i ocena przydatności metody MLPA do szybkiej diagnostyki prenatalnej aneuploidii chromosomów 13, 18, 21 oraz X i Y.

## Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 409 próbek płynu owodniowego, pobieranego w 16-18 tygodniu ciąży w celu oceny kariotypu płodu. Wskazaniem do wykonania badania prenatalnego był wiek ciężarnych (64,3% przypadków), nieprawidłowy wynik przesiewowego testu biochemicznego (17,1% badań), nieprawidłowy wynik badania USG (12,5% badań) oraz inne przyczyny (6,11% badań). Pacjentki wyraziły zgodę na amniopunkcję i wykonanie badania cytogenetycznego.

Kariotyp płodu oceniano metodą konwencjonalnej analizy preparatów chromosomów uzyskiwanych z hodowli komórek płynu owodniowego metodą *in situ*. Do badań z zastosowaniem MLPA kwalifikowano tylko te próbki płynu owodniowego, które w ocenie makroskopowej nie zawierały domieszki krwi oraz takie, w których obecność czerwonych krwinek stwierdzono dopiero po odwirowaniu próbki (6,23%). DNA komórek płynu owodniowego uzyskiwano z zastosowaniem zestawu odczynników QIAmp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Germany) (348 próbek) lub metodą trawienia komórek proteinazą K (20 µg/ml) (61 próbek). Początkowo DNA izolowano z 6ml a następnie z 3ml płynu owodniowego. DNA zagęszczano w ekscytorze (n 33), poprzez zmniejszanie ilości eluentu (n 41) lub oczyszczano i zagęszczano zestawem ZYMO (Exbio, Praga) (n 190). Procedurę izolacji i oczyszczania DNA prowadzono zgodnie z protokołem producenta z niewielkimi modyfikacjami. Polegały one na dwukrotnym płukaniu osadu komórek w buforze PBS, zastosowaniu RNAzy A (100mg/ml) oraz wydłużeniu czasu inkubacji z buforem AL. Uzyskiwano od 5 do 45ng/µl DNA. Do reakcji MLPA wykorzystywano 5µl tzn. 25-225ng DNA.

Badania przeprowadzono z zastosowaniem zestawu sond SALSA MLPA P095 (mrc-Holland). Zawiera on 36 sond, po 8 specyficznych dla chromosomów 13, 18, 21 i X oraz 4 dla chromosomu Y. Zestaw zawiera również 9 sond kontrolnych, umożliwiających ocenę ilości DNA oraz efektywności jego denaturacji. Badania wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta.

Reakcję MLPA prowadzono w termocyklerze Peltier Thermal Cycler DNA Engine (BioRad Life Sciences, CA, USA).

Przydatność metody MLPA do szybkiej prenatalnej identyfikacji aneuploidii.

3µl uzyskanego produktu reakcji PCR poddawano rozdzielności metodą elektroforezy kapilarnej w analizatorze ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA).

Otrzymane wyniki analizowano z zastosowaniem programu GeneMarker V1.70 (SoftGenetics, LLC, State College, USA). Sygnał każdej sondy w analizowanej próbce był porównywany do kontroli syntetycznej, utworzonej ze wszystkich pozostałych badanych próbek. Utworzenie takiej kontroli wymagało równoczesnego badania co najmniej 8 próbek.

Wartości względnej fluorescencji sond (względne wysokości pików) prawidłowej próbki mieściły się w zakresie 0,7-1,3 wartości powyżej 1,3 wskazywały na duplikację natomiast poniżej 0,7 na delecję. (Rycina 1).

## Wyniki

Ogółem wykonano 409 badań diagnostycznych z zastosowaniem metody MLPA. Wynik badania uzyskano w 324 badaniach (79,22%). Najwyższy odsetek wyników (92,1%) otrzymano izolując DNA zestawem Qiamp DNA Blood Midi Kit z zastosowaniem oczyszczania produktu izolacji zestawem ZYMO.

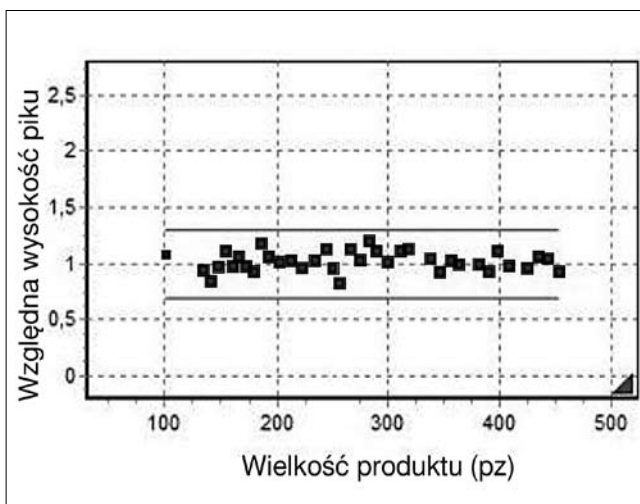
Stwierdzono obecność aberracji w 16 spośród 324 badań (4,9%). Najwyższy odsetek nieprawidłowości (18,4%) stwierdzono w badaniach wykonanych z powodu nieprawidłowego wyniku badania USG. (Tabela I).

W jednym przypadku stwierdzono delecję chromosomu 18 widoczną jako delecję 4 sond z zastosowanego zestawu. (Rycina 2).

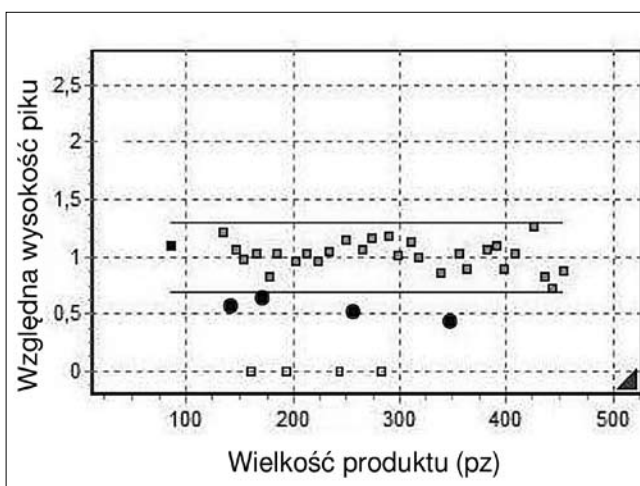
Wszystkie stwierdzone metodą MLPA aberracje zgodne były z aberracjami wykrytymi metodą konwencjonalną. Bezwzględna czułość i specyficzność testu wynosiła 100%. Nie uzyskano wyników fałszywie dodatnich. W 3 badaniach (0,92%) wyniki były fałszywie ujemne ale nie wykryte aberracje chromosomowe z założenia nie mogły być stwierdzone metodą MLPA. (Tabela II).

## Dyskusja

Testy umożliwiające szybką diagnostykę najczęstszych aneuploidii są od wielu już lat szeroko stosowane w badaniach prenatalnych. Metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy, QF-PCR i MLPA mają udokumentowaną przydatność diagnostyczną w tych badaniach i w wielu laboratoriach zastąpiły w ostatnich latach stosowaną wcześniej metodę FISH [10, 11, 13, 16-19].



Rycina 1. Część prawidłowego wyniku analizy MLPA (GeneMarker V1.70). Wartości względnej fluorescencji sond mieszczą się w zakresie 0,7-1,3 (punkty kwadratowe).



Rycina 2. Część wyniku analizy MLPA (GeneMarker V1.70) z delecją chromosomu 18 w regionie q21.1 (delecja sond specyficznych dla prążków q21; q21.1; q21.3; q23 – punkty okrągłe).

Tabela I. Nieprawidłowe wyniki badań metodą MLPA w odniesieniu do wskazań.

Wskazanie do badania	Aberracje stwierdzone metodą MLPA		
	Aneuploidia	Aberracje strukturalne	Ogółem, (%)
Nieprawidłowy wynik badania USG n = 38	7	0	7 (18,42)
Nieprawidłowy wynik biochemicznego testu przesiewowego n = 55	4	1	5 (9,09)
Wiek 35-39 lat n = 211	4	0	4 (1,89)
Inne n = 20	0	0	0
Ogółem n = 324	15	1	16 (4,94)

Tabela II. Aberracje chromosomowe niewykryte metodą MLPA.

Wskazanie do badania	Wynik MLPA	Kariotyp	Odsetek niewykrytych aberracji
Nieprawidłowy wynik biochemicznego testu przesiewowego	XY	46,XY,del(8)(p23.1)	1/55 (1.8%)
Nieprawidłowy wynik badania USG	XX	69,XXX	2/38 (5,2%)
	XX	46,XX,der(22)t(1;22)[6]/46,XX[16]	

Wybór do naszych badań MLPA podyktowany był między innymi tym, że metoda ta jest stosowana także szeroko w diagnostyce zespołów mikrodelecji i aberracji subtelerowych chromosomów. Może więc być wykorzystana do prenatalnej diagnostyki tej patologii [20].

W ocenie przydatności diagnostycznej metody należy uwzględnić przede wszystkim trzy aspekty, techniczny (czułość, swoistość, skuteczność), kliniczny (ograniczenia diagnostyczne), oraz aspekt ekonomiczny (koszt badania w odniesieniu do jego efektu). W naszych badaniach czułość i swoistość metody MLPA w zakresie identyfikacji najczęstszych aneuploidii, podobnie jak w wielu innych badaniach wynosiła 100% [12, 13, 18]. Prawidłowo zidentyfikowano wszystkie przypadki aneuploidii. Skuteczność metody była natomiast znacznie mniejsza niż uzyskiwana przez innych autorów. W około 8% badań z powodu niewystarczającej jakości lub ilości DNA nie uzyskano wyniku badania. Częstość niepowodzeń w innych badaniach, wykonanych w znacznie większych grupach pacjentów, wynosiła od 0,8% - 4,4% [11-13,18]. Większy odsetek niepowodzeń w naszych badaniach można przypisać małemu doświadczeniu w stosowaniu tej metody. Ilość płynu owodniowego (3 ml) stosowana przez nas do izolacji DNA nie odbiegała od tej wykorzystywanej przez innych (1ml-8ml). Hochstenbach podaje, że 1ml powinien być wystarczający do uzyskania wyniku MLPA w ponad 98% badań [17]. Jednak, jak podkreślają to inni autorzy, metoda MLPA jest stosunkowo wrażliwa na jakość DNA [18]. Generalnie, odsetek niepowodzeń badania metodą MLPA jest porównywalny z odsetkiem badań, w których nie uzyskuje się wyniku metodą QF-PCR wynoszącym 0,1-3,7% i metodą FISH 0,0-4,9% [19,21].

Istotną wadą metody MLPA jest brak możliwości wykrywania domieszki komórek matki w przypadku kariotypu żeńskiego oraz identyfikacji triploidii 69, XXX. W związku z tym próbki płynu owodniowego z widoczną makroskopowo domieszką krwi nie mogą być badane tą metodą. Dotyczy to około 0,4-6% badań [11,13, nasze niepublikowane dane]. Próbą rozwiązania tego problemu może być określenie zawartości hemoglobiny płodowej w takich próbkach. Jeśli wynosi ona >85% to badanie może być wykonane [13].

W naszych badaniach we wszystkich tych próbkach płynu owodniowego, w których obecność krwi widoczna była dopiero po odwirowaniu próbki (6,23% badań) uzyskano wynik badania i był on zgodny z wynikiem standardowej oceny kariotypu. Domieszka DNA matczynej w badanej próbce może być przyczyną problemów interpretacji uzyskanego wyniku badania. Sugeruje on wówczas obecność DNA matki lub triploidii 69,XXY.

W naszych badaniach sytuacja taka miała miejsce dwukrotnie. W jednym przypadku stwierdzono prawidłowy kariotyp męski w drugim zaś triploidię. Ten problem diagnostyczny dotyczy niewielkiego odsetka badań (0,2%) i w przypadku nieprawidłowego wyniku badania USG zaleca się rozstrzygnięcie go metodą FISH lub QF-PCR [13].

Najwięcej kontrowersji dotyczących wprowadzenia testów na szybką diagnostykę aneuploidii jako jedyne badania prenatalnego w przypadkach zwiększonego ryzyka tych aberracji budzi ograniczenie badania tylko do tej patologii [14]. Z istoty tego testu diagnostycznego wynika bowiem brak możliwości identyfikacji strukturalnych aberracji chromosomowych mogących mieć poważne skutki kliniczne. W rozważaniach na ten temat nie można jednak pomijać faktu, że niektóre aberracje strukturalne chromosomów analizowanych w teście na aneuploidie metodą MLPA mogą być „rozpoznane” tą metodą. Dowodzi tego zarówno stwierdzenie delecji chromosomu 18q w naszych badaniach jak też doniesienia innych autorów [11-13]. Dzięki temu, że w metodzie MLPA każdy analizowany chromosom reprezentuje 8 sond molekularnych nieprawidłowy profil jednej lub kilku sond może sugerować aberrację strukturalną i konieczność weryfikacji tego wyniku. W naszych badaniach w 3/324 badań (0,92%) nie wykryto aberracji, które z założenia nie mogły być rozpoznane metodą MLPA. Triploidia oraz delecja 8p mają poważne skutki kliniczne. Trzecia stwierdzona w ocenie kariotypu aberracja [der(22)t(1q13; 22q21)] występowała w mozaice z komórkami prawidłowymi. W krwi pępowinowej natomiast wykazano delecję tego samego regionu 22q we wszystkich komórkach. Jest ona odpowiedzialna za zespół mikrodelecji 22q13. Dwie z tych trzech aberracji stwierdzono w badaniach ze względu na nieprawidłowy wynik badania USG. Potwierdza to udokumentowany dla większych grup klinicznych fakt, że największe ryzyko niewykrycia strukturalnej aberracji chromosomowej dotyczy badań z powodu nieprawidłowego wyniku badania USG [2, 12]. W przypadku zwiększonego ryzyka zespołu Downa ryzyko niewykrycia aberracji o poważnych skutkach klinicznych oceniane jest na 0,06-0,1% [22, 23]. Natomiast całkowite ryzyko cytogenetyczne (niezależnie od wskazania do badania) szacowane jest na 1% a 1/3 niewykrytych aberracji może łączyć się z poważnymi skutkami klinicznymi [24, 25].

Podsumowując przydatność kliniczną testu na aneuploidie w badaniach prenatalnych można stwierdzić, że mógłby być on stosowany jako jedyny test w przypadkach zaawansowanego wieku ciężarnej i wyników przesiewowych testów wskazujących na zwiększone ryzyko zespołu Downa. Jeśli wskazaniem do badania jest nieprawidłowy wynik badania USG należy dokonać pełnej oceny kariotypu [13].

Przydatność metody MLPA do szybkiej prenatalnej identyfikacji aneuploidii.

## Wnioski

Metoda MLPA jest wiarygodną metodą szybkiego wykrywania najczęstszych aneuploidii. Stosowanie jej jako jedynego testu diagnostycznego możliwe jest jednak dopiero po uzyskaniu wysokiego, powyżej 98%, poziomu skuteczności i tylko do badań z powodu zwiększonego ryzyka aneuploidii wynikającego z wieku ciężarnej i testów przesiewowych.

Każde badanie powinno być poprzedzone rzetelną informacją o jego istocie i ograniczeniach diagnostycznych.

20. Faas B, Nillesen W, Vermeer S, [et al.]. Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur J Med Genet.* 2008, 51, 511-519.
21. Cirigliano V, Voglino G, Ordonez E, [et al.]. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn.* 2009, 29, 40-49.
22. Ogilvie C, Lashwood A, Chitty L, [et al.]. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down is syndrome testing. *BJOG.* 2005, 112, 1369-1375.
23. Bui T. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon! *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007, 30, 247-251.
24. Caine A, Malthby A, Parkin C, [et al.]. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosome 13, 18 and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet.* 2005, 366, 123-128.
25. Leung W, Lao T. Rapid aneuploidy testing, traditional karyotyping, or both? *Lancet.* 2005, 366, 97-98.

## Piśmiennictwo

1. Jacobs P, Browne C, Gregson N, [et al.]. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 1992, 29, 103-108.
2. Grimshaw G, Szczepura A, Hulten M, [et al.]. Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess.* 2003, 7, 1-146.
3. Pergament E, Chen P, Thangavelu M, Fiddler M. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2000, 20, 215-220.
4. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, [et al.]. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. Evaluation of > 3 000 cases. *Fetal Diagn Ther.* 1999, 14, 193-197.
5. Thilaganathan B, Sairam S, Ballard T, [et al.]. Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *BJOG.* 2000, 107, 262-266.
6. Tepperberg J, Pettenati M, Rao P, [et al.]. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2001, 21, 293-301.
7. Wyandt H, Tonk V, Huang X, [et al.]. Correlation of abnormal rapid FISH and chromosome results from amniocytes for prenatal diagnosis. *Fetal Diagn Ther.* 2006, 21, 235-240.
8. Mann K, Donaghue C, Fox S, [et al.]. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet.* 2004, 12, 907-915.
9. Ramsden S, Mann K, McConnell C, Hastings R. External quality assessment of rapid prenatal detection of numerical chromosomal aberrations using molecular genetic techniques: 3 years experience. *Prenat Diagn.* 2007, 27, 404-408.
10. Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, [et al.]. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1075, 288-298.
11. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind A, [et al.]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis – experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 1119-1125.
12. Kooper A, Faas B, Kater-Baats E, [et al.]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenat Diagn.* 2008, 28, 1004-1010.
13. Van Opstal D, Boter M, de Jong D, [et al.]. Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet.* 2009, 17, 112-121.
14. Bocian E. Przyszłość prenatalnych badań cytogenetycznych: szybki test na aneuploidię czy pełny kariotyp. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 881-887.
15. Schouten J, McElgun C, Waaijer R, [et al.]. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 57.
16. Nicolini U, Lalatta F, Curcio C, [et al.]. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update.* 2004, 10, 541-448.
17. Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, [et al.]. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn.* 2005, 25, 1032-1039.
18. Boormans E, Birnie E, Oepkes D, [et al.]. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and karyotyping in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2010, 115, 297-303.
19. Shaffer L, Bui T. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007, 145, 87-98.