



Conferencia de consenso

## Recomendaciones para el uso de microarrays en el diagnóstico prenatal<sup>☆</sup>



Javier Suela<sup>a,\*</sup>, Isabel López-Expósito<sup>b</sup>, María Eugenia Querejeta<sup>c</sup>, Rosa Martorell<sup>d</sup>, Esther Cuatrecasas<sup>e</sup>, Lluís Armengol<sup>f</sup>, Eugenia Antolín<sup>g</sup>, Elena Domínguez Garrido<sup>h</sup>, María José Trujillo-Tiebas<sup>i,j</sup>, Jordi Rosell<sup>k</sup>, Javier García Planells<sup>l</sup>, Juan Cruz Cigudosa<sup>m</sup> y Grupo de diagnóstico prenatal del INGEMM<sup>◇</sup> Grupo de genética prenatal del Hospital Clínico San Carlos<sup>◇◇</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Genómica, NIMGenetics, Madrid, España

<sup>b</sup> Sección de Citogenética, Centro de Bioquímica y Genética Clínica, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

<sup>c</sup> Unidad de Genética Celular, Policlínica Gipuzkoa, San Sebastián, España

<sup>d</sup> Secció Genètica, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, España

<sup>e</sup> Departament de Citogenètica, Anàlisis Mèdiques Barcelona (AMBAR), Barcelona, España

<sup>f</sup> Departamento de Investigación y Desarrollo, Laboratorio Genomics, Barcelona, España

<sup>g</sup> Sección de Ecografía y Medicina Fetal, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

<sup>h</sup> Unidad de Diagnóstico Molecular, Fundación Rioja Salud, CIBIR, Logroño, España

<sup>i</sup> Servicio de Genética, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España

<sup>j</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>k</sup> Secció Genètica, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, España

<sup>l</sup> Instituto de Medicina Genómica, Paterna, Valencia, España

<sup>m</sup> Grupo de Citogenética Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 19 de octubre de 2016

Aceptado el 14 de diciembre de 2016

On-line el 21 de febrero de 2017

Palabras clave:

Microarray

Diagnóstico prenatal

Diagnóstico genético

### RESUMEN

La tecnología de microarrays, de reciente implantación en el diagnóstico prenatal internacional, se ha convertido en uno de los pilares de este diagnóstico en cuanto a su capacidad de detección y objetividad de resultados. La presente guía comprende una exposición general de la tecnología, incluyendo aspectos técnicos y diagnósticos a tener en cuenta. En concreto, se definen: los distintos tipos de muestras prenatales que se van a utilizar (biopsia de vellosidades coriónicas, líquido amniótico, sangre procedente de cordón umbilical o material procedente de restos abortivos) así como las particularidades de cada una de ellas; qué puntos hay que tener en cuenta de cara a la elaboración de un consentimiento informado y de la emisión de un informe de microarray prenatal, especialmente en el caso de la posible definición de variantes de significado incierto; las limitaciones inherentes a la técnica que deben ser tenidas en cuenta a la hora de recomendar su uso diagnóstico; así como un algoritmo pormenorizado de situaciones clínicas, donde se recomienda el uso de microarrays y su incorporación a la rutina clínica en el contexto de otras pruebas genéticas, incluyendo embarazos con antecedentes familiares o hallazgos sugerentes de un síndrome concreto, translucencia nucal incrementada en el primer trimestre o cardiopatía congénita en el segundo trimestre y hallazgos ecográficos no relacionados con un síndrome conocido o específico. Esta guía ha sido coordinada por la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP), la Asociación Española de Genética Humana (AEGH) y la Sociedad Española de Genética Clínica y Dismorfología (SEGCD).

© 2017 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

<sup>☆</sup> Grupo de trabajo coordinado por la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP), Asociación Española de Genética Humana (AEGH) y la Sociedad Española de Genética Clínica y Dismorfología (SEGCD).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jsuela@nimgenetics.com](mailto:jsuela@nimgenetics.com) (J. Suela).

<sup>◇</sup> Grupo de Diagnóstico Prenatal del INGEMM: María Ángeles Mori, María Palomares, Fe García-Santiago, Elena Mansilla, Pablo Lapunzina, Julián Nevado. Instituto de Genética Médica y molecular (INGEMM). Hospital Universitario la Paz, Madrid.

<sup>◇◇</sup> Grupo de Genética Prenatal del Hospital Clínico San Carlos: Carmen Cotarelo, María Fenollar. Laboratorio de Genética Clínica, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.12.028>

0025-7753/© 2017 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Recommendations for the use of microarrays in prenatal diagnosis

### A B S T R A C T

**Keywords:**  
Microarray  
Prenatal diagnosis  
Genetic diagnosis

Microarray technology, recently implemented in international prenatal diagnosis systems, has become one of the main techniques in this field in terms of detection rate and objectivity of the results. This guideline attempts to provide background information on this technology, including technical and diagnostic aspects to be considered. Specifically, this guideline defines: the different prenatal sample types to be used, as well as their characteristics (chorionic villi samples, amniotic fluid, fetal cord blood or miscarriage tissue material); variant reporting policies (including variants of uncertain significance) to be considered in informed consents and prenatal microarray reports; microarray limitations inherent to the technique and which must be taken into account when recommending microarray testing for diagnosis; a detailed clinical algorithm recommending the use of microarray testing and its introduction into routine clinical practice within the context of other genetic tests, including pregnancies in families with a genetic history or specific syndrome suspicion, first trimester increased nuchal translucency or second trimester heart malformation and ultrasound findings not related to a known or specific syndrome. This guideline has been coordinated by the Spanish Association for Prenatal Diagnosis (AEDP, «Asociación Española de Diagnóstico Prenatal»), the Spanish Human Genetics Association (AEGH, «Asociación Española de Genética Humana») and the Spanish Society of Clinical Genetics and Dysmorphology (SEGcYD, «Sociedad Española de Genética Clínica y Dismorfología»).

© 2017 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

### Introducción

Gracias al descubrimiento del número cromosómico del cariotipo humano y, en especial, a las aplicaciones derivadas de ello, como la asociación de la trisomía 21 al síndrome de Down, la citogenética ha sido, durante décadas, la piedra angular en el diagnóstico genético de diversas áreas, incluyendo el diagnóstico prenatal y el diagnóstico posnatal, a nivel neuropediátrico y dismorfológico (entre otros). Recientemente, los *chromosomal microarray* (CMA, «microarrays genómicos»), array-CGH o array-SNP (según la tecnología interna empleada en su diseño y lectura) se han incorporado al grupo de herramientas genómicas para el diagnóstico genético. Esta tecnología supera, en muchos aspectos, las propiedades del cariotipo en términos de rendimiento diagnóstico, precisión y resolución. Debido a ello, diversas guías de trabajo internacionales sugieren sustituir, en ciertos campos del diagnóstico prenatal y el posnatal, el cariotipo convencional por los microarrays como herramienta diagnóstica de primera línea.

En su conjunto, los microarrays engloban diversas tecnologías y resoluciones analíticas que permiten la detección de lo que se conoce como *copy number variations* (CNV, «variantes de número de copia»). Las CNV se definieron inicialmente como segmentos de ADN, mayores de una kilobase, cuyo número de copia difiere de un genoma de referencia<sup>1</sup>. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones clínicas desarrolladas en forma de microarrays no llegan a tal nivel de resolución, debido a la complejidad analítica de las plataformas de alta resolución.

Tal es el interés clínico que despierta la tecnología de microarrays que un gran número de consorcios y asociaciones profesionales no solo recomiendan su uso, sino que intentan definir una serie de recomendaciones que deberían ser de aplicación general. Estas recomendaciones, no obstante, son de carácter bastante general, incluyendo su aplicación en el diagnóstico de enfermedades neuropediátricas (como las guías clínicas de la ACMG)<sup>2,3</sup> y obstétricas (como las recomendaciones de comité del *American College of Obstetricians and Gynecologists* [ACOG, «Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología»])<sup>4</sup>.

En el panorama nacional, sin embargo, no existe hasta la fecha una guía de recomendaciones consensuada por diversos expertos del ámbito de diagnóstico prenatal que concrete el uso de los microarrays aunque sí están publicados, por una parte, un consenso de implantación de dicha tecnología, impulsado por el Instituto

Roche<sup>5</sup>, y, por otra, unas recomendaciones del comité de la *Societat Catalana de Obstetricia i Ginecologia*<sup>6</sup>.

### El diagnóstico prenatal

Desde el descubrimiento de la trisomía 21 asociada al síndrome de Down<sup>7</sup>, el cariotipo convencional ha sido la técnica de primera elección para el diagnóstico prenatal en casos de alto riesgo en los cribados combinados, malformación ecográfica sugerente de cromosomopatía, antecedentes familiares y otras indicaciones<sup>8</sup>. Existen, adicionalmente, otras circunstancias donde las guías de trabajo internacionales no indican la necesidad de realizar un cariotipo convencional, tales como los síndromes metabólicos o un fenotipo sugerente de mutación genética (no detectable por cariotipo) ([www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html](http://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html))<sup>9</sup>. A pesar de ello, muchos centros diagnósticos optan por realizar un cariotipo de manera concomitante y, según se refleja en la bibliografía médica, muchos de los progenitores con sospecha de enfermedad monogénica deciden realizar un cariotipo convencional de manera complementaria<sup>10</sup>. Por lo tanto, se puede generalizar el hecho de que el cariotipo es una técnica prácticamente universal en el diagnóstico prenatal.

La técnica *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR) o la *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH, «hibridación in situ fluorescente») de aneuploidías constituyen las llamadas técnicas rápidas. Permiten analizar la presencia de aneuploidías en los cromosomas 21, 18, 13, X e Y (cariotipo y CMA analizan todos los cromosomas). A diferencia del cariotipo, no permiten conocer la arquitectura cromosómica que subyace a las aneuploidías (por ejemplo, sería imposible saber si existe una trisomía producida por translocación robertsoniana) ni la presencia de microdeleciones. Son, sin embargo, extraordinariamente rápidas al compararse con el cariotipo convencional y los microarrays (la QF-PCR tiene una respuesta media de 24 h) lo que las convierte en técnicas de elección, ya sea en paralelo o aisladas, especialmente en aquellos casos con una sospecha sindrómica clara (por ejemplo, en casos con alto riesgo de trisomía 21 detectado por cribado)<sup>11</sup>.

En los últimos años se ha visto cómo los microarrays aparecen como un claro sustituto del uso, en primera línea, del cariotipo convencional en aquellas situaciones en las que este era y es habitualmente recomendado<sup>12–17</sup>. Con todas estas evidencias, varias

sociedades científicas han ido introduciendo paulatinamente la recomendación del uso de los microarrays en el diagnóstico prenatal. Por ejemplo, el ACOG ha modificado recientemente sus recomendaciones para el uso de CMA en el diagnóstico prenatal: desde unas circunstancias clínicas muy reducidas, como segunda opinión en casos con malformación ecográfica y cariotipo normal o fallido<sup>18</sup>, hasta la situación actual donde lo recomiendan como prueba de primera elección en aquellos embarazos con alteración fetal detectable por ecografía o muerte fetal, entre otras situaciones<sup>4</sup>.

Diversos estudios ya publicados han evaluado la viabilidad de los microarrays en diagnóstico prenatal en grandes cohortes y está demostrado que la mayoría de las alteraciones (un 99,5%) detectadas por cariotipo serían también detectables por microarrays, observándose aproximadamente un 8-12% de enfermedad adicional en aquellos fetos con malformación ecográfica y cariotipo normal<sup>19,20</sup>. Por ello, parece evidente considerar los microarrays como una técnica de enorme interés en el diagnóstico prenatal. No obstante, debido a su coste intrínseco, a que su tiempo de respuesta es adecuado pero no excesivamente rápido (normalmente 3-5 días laborables) y a que, por otra parte, no puede detectar triploidías (en el caso de los array-CGH), algunas publicaciones indican la posibilidad de realizar un estudio previo de QF-PCR de aquellas trisomías más comunes (13, 18, 21, X e Y)<sup>21</sup>. Otras publicaciones, sin embargo, no recomiendan dicho uso combinando, optando exclusivamente por los microarrays y recomendando, si se desea detectar la triploidía por un sistema que no sea meramente ecográfico, el uso de array-SNP en las plataformas de arrays utilizadas<sup>19,22</sup>.

### Aspectos técnicos de los microarrays

#### Tipos de muestras a analizar en diagnóstico prenatal

Técnicamente, los microarrays precisan de una pequeña cantidad de ADN (aproximadamente 500 ng para la mayoría de los estudios) para poder ser realizados. A diferencia del cariotipo, no se requieren células en metafase (con lo que, si existe una fuente suficiente de ADN, no es necesario un cultivo celular), lo que le permite ser una técnica relativamente rápida (los resultados estarían disponibles en 1-2 semanas) si bien es necesario conocer las fuentes de material disponibles con sus puntos a favor y en contra a la hora de realizar un CMA:

1. **Biopsia de vellosidades coriales.** A diferencia de otras técnicas invasivas, la biopsia de vellosidades coriales tiene la problemática de poder presentar mosaicismos cromosómicos confinados a placenta, además del riesgo de contaminación materna. Debido a que los CMA no permiten diferenciar entre 2 linajes diferentes, sino que presentan de forma conjunta toda la información poblacional analizada, siempre que sea analizado material procedente de biopsia de vellosidades coriales es recomendable realizar un estudio de exclusión de contaminación materna (STR/QF-PCR) comparando el patrón de la muestra con el patrón materno (o, al menos, tras detectar que la muestra procedente de biopsia de vellosidades coriales es de sexo femenino o presenta una mezcla en la dotación de cromosomas sexuales, XX/XY). Una contaminación materna visible por esta técnica debe ser informada, ya que puede influir en los resultados de estudios posteriores. Es muy importante tener en cuenta que la biopsia de vellosidades coriales puede presentar mosaicismos de confinamiento placentario en diversas aneuploidías y variaciones genómicas. Se estima que un 2% de las anomalías citogenéticas detectadas en las biopsias de vellosidades coriales pueden tener un origen exclusivamente placentario por lo que, en ausencia de anomalías ecográficas, se recomienda confirmar el hallazgo genético en la biopsia con material procedente de una extracción de líquido amniótico<sup>23</sup>. Es recomendable, si hay muestra suficiente, la

realización en paralelo de un cultivo celular que permita disponer de más material genético, sea para confirmación o para otras técnicas moleculares.

2. **Líquido amniótico.** A pesar de que la biopsia de vellosidades coriales es una técnica relevante en el diagnóstico prenatal, la gran mayoría de las determinaciones que se realizarán con CMA utilizan material procedente de líquido amniótico. La razón evidente es que la amniocentesis se lleva a cabo, rutinariamente, a partir de la semana 15, y puede hacerse por encima de la semana 20, lo que permite realizarla ante una sospecha ecográfica. A diferencia de la biopsia de vellosidades coriales, el material de líquido amniótico no presenta una tasa tan elevada de mosaicismos de confinamiento de tejido, aunque sí puede tener contaminación materna, que habitualmente se hace evidente cuando el líquido es hemático. En esos casos se recomienda realizar un cultivo celular de los amniocitos que descarte el análisis de material materno. A veces, en especial en las amniocentesis más tempranas, el material de las células flotantes puede ser insuficiente en cuanto a la cantidad y/o calidad para realizar un CMA; es por ello recomendable, también para disponer de más material genético para pruebas posteriores, disponer de un cultivo celular confluyente (como por ejemplo el utilizado para técnicas de citogenética), teniendo en cuenta la demora de tiempo resultante y la posibilidad, remota, de selección clonal como artefacto del cultivo.
3. **Cordocentesis (muestra de sangre fetal).** A pesar de que es la técnica idónea para cualquier estudio genético por CMA, los plazos de su obtención (semanas 19-21) así como el riesgo de pérdida y complicaciones fetales, hacen que la cordocentesis sea la técnica menos utilizada en diagnóstico genético prenatal invasivo. No tiene el peligro de contaminación materna (si la extracción se ha hecho correctamente) ni la presencia de mosaicismos de confinamiento no fetal, aunque sí puede presentar un riesgo de falsos negativos en algunos síndromes en mosaico, como el síndrome de Pallister-Killian (donde las células sanguíneas no siempre portan la alteración genética).
4. **Restos abortivos.** Un CMA puede ser utilizado para analizar restos abortivos. Si el material de partida no es material fetal claramente diferenciado (por ejemplo, en un legrado), es recomendable realizar una técnica de exclusión de contaminación materna previa al análisis.

#### Evaluación de las variantes de significado incierto

A pesar de que la técnica de microarrays tiene grandes ventajas en cuanto al rendimiento diagnóstico en el ámbito prenatal, existe el riesgo de detección de alteraciones o variaciones que, si bien no son identificadas como benignas, no tienen por qué contribuir a la aparición de una enfermedad en un individuo portador. Un grupo de estas alteraciones es el conocido como *variants of uncertain significance* (VOUS o VUS, «variantes de significado incierto»), es decir, aquellas variaciones cuya función no es conocida en el momento del diagnóstico<sup>24</sup>. Otro grupo son aquellas CNV que podrían no tener relación alguna con el fenotipo observado<sup>25</sup>, lo que comúnmente se denominan hallazgos incidentales o resultados no esperados. Y por último, también está el grupo de alteraciones que tan solo confieren susceptibilidad (y no certeza) a padecer un trastorno determinado, ya sea por causa de expresividad fenotípica variable o por una penetrancia incompleta<sup>26</sup>. La inclusión dentro del informe genético, o no, de estos grupos de alteraciones en el CMA prenatal está sometida a continuo debate. Algunos autores sugieren la utilización de CMA de alta resolución en el diagnóstico prenatal y estudiar y describir todos los resultados en la consulta de asesoramiento genético<sup>27</sup>, otros aconsejan informar solo de aquellos cambios con significación clínica conocida<sup>28</sup>. En relación con ese último punto, es de especial interés la publicación

de una reciente iniciativa de diversos expertos belgas para describir en qué circunstancias se recomendaría informar determinados cambios detectables por CMA<sup>29</sup>, haciendo hincapié en que ciertas alteraciones, especialmente aquellas con una expresividad variable o penetrancia incompleta, deben ser informadas solo en caso de que exista una concordancia entre el fenotipo ecográfico y el hallazgo detectado.

Debido a que el feto es un individuo *no nato*, sin un fenotipo directo (solo hallazgos indirectos como la ecografía), es complejo establecer una asociación clara y diagnóstica de determinadas alteraciones genéticas con determinados síndromes de penetrancia incompleta o con trastornos complejos como el autismo, sin evidencias claras o antecedentes familiares (siempre que la alteración presente una alta penetrancia o exista un historial familiar patológico bien documentado).

La estrategia del uso de microarrays en el contexto del diagnóstico prenatal debe ser orientada a facilitar al facultativo toda la información de importancia relevante, teniendo en cuenta que:

1. Debe realizarse un estudio pormenorizado de las regiones sindrómicas de interés prenatal, evitando un exceso de resolución en aquellas regiones con escasa información clínica. Debe informarse en el consentimiento informado de la resolución real de la técnica. Algunos autores<sup>29</sup> recomiendan el uso de plataformas de array-CGH para diagnóstico prenatal con una resolución mínima global de aproximadamente 400 kb, aunque no existe un consenso general a nivel europeo. Por ejemplo, el esquema de intercomparación de la CEQAS, no considera necesaria esta resolución mínima.
2. Debe establecerse *a priori* un algoritmo a la hora de informar la detección de variantes de significado incierto o de penetrancia incompleta, previamente a la realización del CMA. La estrategia elegida, sea (i) informar de todos los hallazgos, (ii) informar de todos los hallazgos compatibles con antecedentes/hallazgo ecográfico, o (iii) no informar de estos hallazgos, debe ser claramente señalada en el consentimiento informado para que la gestante conozca previamente lo que se va a reportar. En el caso de informar de todos los hallazgos, debe notificarse a la gestante claramente de las consecuencias clínicas de cada uno de los mismos, cuando esa información esté disponible en la literatura médica. En todo caso, es crucial tener disponibilidad de toda la información clínica relevante, así como de los posibles antecedentes familiares, a la hora de interpretar los hallazgos detectados en el CMA.
3. En el consentimiento informado debe informarse claramente de las limitaciones del estudio, tales como la falta de detección de enfermedad producida por CNV de un tamaño inferior a la resolución del microarray, mutaciones puntuales, expansiones de tripletes u otros.
4. La información indicada en el informe debe ser relativa al diagnóstico prenatal, apoyada en bibliografía o evidencias clínicas y evitando la asociación con estudios experimentales.
5. Siempre que sea posible, es conveniente disponer de las muestras parentales para determinar la posible herencia de una variante identificada en el feto, tanto para la asociación fenotípica como para un correcto consejo genético postest.

#### Limitaciones de la técnica

A pesar de que en conjunto los microarrays son una tecnología de gran utilidad con una serie de ventajas frente a otras alternativas citogenéticas, no están exentas de limitaciones que deberían tenerse en cuenta a la hora de aprobar su uso para un caso específico:

- A. En el caso de que exista una sospecha de una CNV de pequeño tamaño, como por ejemplo una delección intragénica, hay que tener en cuenta la resolución del microarray que se va a utilizar para plantear su uso, así como la presencia de sondas en esa región. Si la resolución analítica no es suficiente, deberían recomendarse otras estrategias de detección orientada a exones, como el MLPA, o de microarrays de mayor resolución.
- B. Los microarrays no pueden detectar aquellas alteraciones genéticas causadas por mecanismos que no impliquen ganancia o pérdida de material genético (como por ejemplo mutaciones puntuales o pequeñas in/dels). Por ello, todos los síndromes asociados a ese tipo de mutaciones serán invisibles a esta técnica. Esto es relevante para la posible identificación de alteraciones patológicas que puedan justificarse tanto por CNV como por mutaciones. En estas situaciones, es necesario informar de ese hecho a la gestante en el caso de sospecha diagnóstica (por ejemplo, el síndrome de Sotos o la distrofia muscular de Duchenne/Becker).
- C. Asimismo, tampoco es posible detectar expansiones de tripletes ni secuencias repetitivas, por lo que no podrían diagnosticarse síndromes como el síndrome de X-frágil, las distrofias miotónicas (como la de Steinert), la atrofia espinal o el síndrome facioescapulohumeral, entre otros.
- D. Debido a que el CMA no es una técnica eficaz para la detección de la disomía uniparental, debe recomendarse un estudio de metilación cuando exista sospecha de las siguientes enfermedades: síndrome de Silver-Russell, síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Prader-Willi/Angelman. En los 2 primeros (Silver-Russell y Beckwith-Wiedemann) el CMA no es una alternativa eficaz; en el caso de Prader-Willi/Angelman la primera opción diagnóstica debe ser el CMA y, en caso de negatividad, recomendar técnica de metilación. A pesar de que las estrategias de array-SNP podrían detectar las regiones de homocigosidad reponsables de estos síndromes, hay que especificar que, en el caso de no realizar un estudio simultáneo con la muestra de los progenitores, solo se detectarán las disomías uniparentales causadas por homodisomía (2 cromosomas paternos/maternos idénticos) pero no se detectarán aquellas disomías uniparentales causadas por heterodisomía.
- E. Los microarrays no son tan eficaces como la FISH en la detección de mosaicismos de bajo grado; la tecnología de array-CGH detecta mosaicismos por encima de un 20-30% de la población celular total (no obstante, la tecnología de array-SNP podría detectar un mosaico del 10-15% del total de la población celular). Asimismo, ningún microarray puede diferenciar la población clonal, analizando el estado de número de copia en su conjunto. Esto puede generar un problema en mosaicos complejos, como por ejemplo 45,X/46,XX/47,XXX.
- F. Por último, los CMA realizados por la tecnología de array-CGH no pueden detectar triploidías (los que se hacen mediante arrays-SNP sí podrían detectarlas) ni la presencia de contaminación celular materna.

#### Objetivos de la guía

En la actualidad existe un amplio y variado uso de la tecnología de microarrays en el diagnóstico prenatal en España. Existen centros que han implementado el uso de microarrays a todas las embarazadas que han sido sometidas a una técnica invasiva (independientemente de la razón clínica), hay también centros que realizan estudios de CMA en base a unas indicaciones específicas y, por último, hay centros que aún no han incorporado el uso de dicha tecnología, ni siquiera en aquellas situaciones en las que está recomendada internacionalmente.

La presente guía pretende abordar el uso de los microarrays en las situaciones más habituales en las que se va a encontrar el diagnóstico genético prenatal, con el objeto de sugerir recomendaciones para su implantación. Esta guía no pretende generar una sistemática sobre la interpretación de los resultados de dicha tecnología.

### Sistemática para la elaboración, revisión, aceptación y actualización de la guía

A la hora de evaluar dicha guía, los presidentes de la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal (AEDP) y la Asociación Española de Genética Humana (AEGH), en representación de sus respectivas juntas directivas, eligieron un coordinador con experiencia reputada en el sector para coordinar y escribir la guía de trabajo. A continuación se constituyó un grupo de trabajo con un panel de expertos en genética y diagnóstico prenatal dentro de la AEDP y la AEGH. Una vez constituido el grupo (los autores firmantes de la guía) el coordinador y los presidentes expusieron el objetivo del proyecto, evaluando los usos potenciales principales de la tecnología de microarrays en el diagnóstico prenatal; estos usos fueron recogidos gracias al uso de diversas guías internacionales (por ejemplo, las recomendaciones de la ACOG<sup>4</sup>). Tras la aceptación de dichos usos potenciales principales, se realizó una revisión bibliográfica mediante herramientas de búsqueda indexada (Pubmed) para cada uno de los usos con el objeto de generar un documento inicial. Dicho documento de revisión fue revisado por todos los miembros del grupo de expertos (añadiendo toda aquella información de interés o relevante para la presente guía, así como excluyendo aquello que los miembros del grupo consideraron), realizando un documento de consenso que permitió poder formular las recomendaciones finales. Las recomendaciones, asimismo, fueron revisadas y aceptadas por el comité de expertos.

Tras la edición final del documento de consenso, se envió el documento a 3 expertos externos, según el protocolo AGREE II (<http://www.agreertrust.org>)<sup>30</sup>. Los 3 expertos evaluaron la guía y remitieron sus observaciones a la coordinación de la misma. Finalmente, el documento definitivo fue revisado de nuevo por el grupo de trabajo y remitido a los expertos para su aceptación final. Las sociedades AEDP y AEGH se encargarán de la difusión de la guía publicada a todos sus socios y profesionales del sector. Asimismo, la guía estará incluida en la información online de ambas sociedades.

### Población y profesionales a quien va dirigida la guía

Por ello, esta guía está orientada a todos aquellos profesionales relacionados con el diagnóstico prenatal, especialmente aquellos involucrados en el diagnóstico genético prenatal invasivo (obstetras, especialistas en medicina fetal, analistas clínicos, genetistas, matronas), con el objeto de disponer de información actualizada respecto a la tecnología de microarrays en el diagnóstico prenatal, de cara a ser aplicada en la rutina clínica, tanto en su aplicación a la población diana (gestantes y sus fetos) como para el asesoramiento pre- y postest de dicha prueba.

### Revisión y actualización de la guía

Se propone una revisión anual de la guía para su actualización, desde la publicación de la misma, en el caso de que sea necesario. Para ello se contactará con todo el grupo de trabajo para plantear la revisión de los puntos de interés.

### Recomendaciones de uso

Las situaciones analizadas son: (i) embarazo con antecedentes personales/familiares o hallazgo sugerente de malformación de un

síndrome concreto, (ii) translucencia nual (TN) incrementada en el primer trimestre (superior al percentil P99), (iii) cardiopatía congénita en el segundo trimestre y, por último, (iv) hallazgos ecográficos no sugerentes de un síndrome conocido o específico.

(i) *Antecedentes personales/familiares previos o hallazgo ecográfico sugerente de anomalía fetal asociada a una alteración genética o síndrome específico.*

Ante un síndrome de microduplicación/microdelección comprobado en un familiar afecto de primer orden, el diagnóstico prenatal en un embarazo posterior puede realizarse por cualquier técnica (microarrays, FISH, MLPA, etc.) que permita evaluar la presencia, en el feto, de la misma alteración detectada en el familiar. La presencia de un familiar/progenitor afecto con estudio molecular positivo requiere obligatoriamente de un asesoramiento genético que informe de los riesgos de recurrencia.

Igualmente, ante la sospecha de un síndrome concreto, es necesario realizar un estudio y asesoramiento preanalítico que permita evaluar la técnica diagnóstica de elección para obtener el máximo rendimiento diagnóstico posible. Es importante señalar que, en el caso de sospecha ecográfica de un síndrome concreto detectable por microdelección o microduplicación, los CMA pueden ser una herramienta útil para detectar otras alteraciones que actúen como fenocopia (por ejemplo, el síndrome de DiGeorge, que puede ser explicado por la delección de 2 regiones genómicas distintas, 22q11.21 y 10p14).

(ii) *TN superior al percentil P99*

La TN es el marcador ecográfico más eficaz en el cribado de las aneuploidías más frecuentes en el primer trimestre, cuya medida se realiza entre las semanas de gestación 10-13. Se mide el espacio sonoluscente situado en la zona posterior de la nuca obtenido en un plano medio del feto y expresado en milímetros con resolución en décimas de milímetros, y, cuando está aumentado, constituye un factor de riesgo asociado a una posible anomalía genética, como la trisomía del cromosoma 21 o la monosomía del cromosoma X. Las cromosopatías se encuentran en el 37% de las TN aumentadas<sup>32</sup> y en el 50-75% de los higromas quísticos<sup>33,34</sup>.

En estudios posteriores, la TN elevada en el primer trimestre (por encima del percentil P99) se asoció también con un mayor riesgo de cardiopatía congénita<sup>35</sup> y a otras muchas malformaciones (como hernia diafragmática o displasias esqueléticas). Debido a esta asociación, la TN es un factor de riesgo a tener en cuenta a la hora de realizar un diagnóstico prenatal invasivo, ya sea exclusivamente por cariotipo<sup>36</sup> o combinada con otras tecnologías, tales como la QF-PCR<sup>37</sup> o los CMA<sup>38</sup>. De hecho, diversas publicaciones proponen, en casos de TN incrementada, el uso de una QF-PCR como primera línea de diagnóstico<sup>21,39</sup>.

El uso de CMA en casos con una TN incrementada, como único marcador aislado, ha estado en debate dada, en inicio, su baja rentabilidad diagnóstica en función de las series. Estudios previos con otras tecnologías combinadas al cariotipo, como en el caso de FISH para la detección del síndrome de delección 22q11.2<sup>40,41</sup>, estudios de MLPA combinando subtelómeros y paneles de microdelección<sup>42</sup> o estudios con CMA<sup>43</sup> demostraron una nula rentabilidad diagnóstica en casos con TN incrementada y cariotipo normal, si bien las series eran pequeñas (menos de 1.000 embarazadas), sugiriendo, en estos casos, esperar a una posterior aparición ecográfica de malformación cardíaca asociada. Sin embargo, recientes publicaciones, describen un 5-10% de fetos con CMA patológico cuando existe una TN aumentada y cariotipo normal<sup>38,44</sup>. En definitiva, las últimas investigaciones hacen recomendar el uso de array-CGH en TN aumentada y cariotipo normal.

El cribado combinado de primer trimestre (que incluye también datos epidemiológicos y bioquímica de la gestante) indica la posibilidad de riesgo de trisomía del cromosoma 21 y del cromosoma 18. Ante un resultado de alto riesgo en el cribado combinado, con puntos de cortes establecidos entre 1/250-1/270 en la mayoría de

**Tabla 1**  
Recomendaciones del uso de microarrays en el diagnóstico prenatal

Procedimiento recomendado (siempre realizar consejo genético pre- y postest)			
Situación	Grado de recomendación/evidencia <sup>a</sup>	Primera línea de análisis recomendado	Segunda <sup>a</sup> línea de análisis recomendado
Antecedentes personales/familiares previos o hallazgo ecográfico sugerente de anomalía fetal asociada a una alteración genética o síndrome específico	A/1c <sup>31</sup>	<b>Técnica gold standard</b> específica de acuerdo a las guías clínicas o guías de buenas prácticas publicadas <b>Se debe conocer, en la medida de lo posible, la mutación o alteración presente en el caso índice</b> (familiar de primer orden) En caso de que se desconozca la causa genética, debe realizarse el estudio <i>gold standard</i> recomendado para estos casos	<b>Microarray prenatal/QF-PCR/cariotipo</b> que descarte la presencia de aneuploidías/microdeleciones comunes que pudieran justificar, parcialmente, la enfermedad descrita (siempre que se crea relevante)
Translucencia nucal > P99 1T, y/o sospecha ecográfica de cardiopatía congénita	A/1b <sup>19,44</sup>	<b>QF-PCR/FISH</b> para T21, T18, T13, X0, XXY <b>Si positivo, cariotipo en muestra prenatal y/o progenitores</b> , para descartar translocación robertsoniana (en cromosomas 13 y 21) o aneuploidía sexual (X0, XXY) en mosaico en los progenitores	<b>Microarray prenatal</b> <b>Si positivo, estudio citogenético dirigido a los progenitores</b> , para descartar aparición de reordenamiento equilibrado en progenitores o microdelección debido a mosaicismos de carácter hereditario
Ecografía con anomalía fetal inespecífica	A/1b <sup>4,19,48</sup>	<b>Microarray prenatal</b> (en malformaciones en el primer trimestre, puede plantearse el estudio genético por QF-PCR/cariotipo para descartar la presencia aneuploidías cromosómicas y de triploidía)	<b>QF-PCR/FISH</b> para descartar la presencia de una triploidía y aneuploidías cromosómicas (en malformaciones fácilmente diagnosticables en el primer trimestre donde el estudio se iniciaría por QF-PCR/cariotipo, realizar estudio por CMA) <b>Si negativo, evaluación ecográfica posterior para orientar el estudio genético</b> a la aparición de un síndrome genético más concreto, causado por mutación, metilación o expansión de fragmentos de ADN, entre otros

<sup>a</sup> Utilizando la clasificación de estudios de diagnóstico del *Centre for Evidence-Based Medicine*, Oxford<sup>51</sup>.

los centros, la recomendación es la misma que en el caso de TN incrementada, dado que, aunque el cribado está dirigido a la detección de las aneuploidías más frecuentes, es posible detectar otras anomalías en cariotipo distintas a las esperadas<sup>45</sup>.

### (iii) Detección ecográfica de cardiopatía congénita

La detección ecográfica de una cardiopatía congénita suele realizarse en el segundo trimestre. Algunas de ellas se habrán expresado como TN elevada en el primer trimestre, habiendo realizado una prueba invasiva que habrá descartado, mediante técnica rápida (y/o cariotipo) la presencia de las aneuploidías más frecuentes. En aquellos casos donde no se detectó dicha TN, el protocolo recomendado es similar a si se hubiera detectado, es decir, análisis de las aneuploidías más frecuentes (21, 18, 13, X e Y).

Una vez descartada la presencia de dichas alteraciones, se recomienda el uso de microarrays para el estudio de otros síndromes cromosómicos no detectables por cariotipo/QF-PCR. La bibliografía indica que, ante una cardiopatía aislada, y una vez descartadas las aneuploidías, se detectan un 7% de alteraciones mediante microarrays, porcentaje que se eleva hasta un 12% si se encuentran otros sistemas afectados, incluyendo la microdelección 22q11.2<sup>20</sup>.

En el caso de que, posteriormente, se detecte ecográficamente una cardiopatía congénita, existen diversos síndromes cuya incidencia es relativamente alta ante dichos hallazgos ecográficos, por ejemplo, el síndrome de microdelección 22q11.2 (asociado a defectos conotruncales) o el de Williams-Beuren (que puede asociarse a una estenosis pulmonar, estenosis aórtica y/o a una hipoplasia de cavidades izquierdas). Determinar claramente el tipo de cardiopatía congénita ha sido crucial a la hora de escoger la estrategia de detección de enfermedad citogenética, vía FISH o MLPA. Debido a que los CMA permiten detectar, simultáneamente, la mayoría de los síndromes citogenéticos asociados a cardiopatía, este tipo de

determinación seguirá siendo importante para realizar un correcto consejo genético pero no para la elección de una u otra plataforma de análisis (como sí ocurre, por ejemplo, con la FISH).

Adicionalmente, hay algunos síndromes, con carácter de penetrancia incompleta, que podrían estar asociadas a cardiopatía congénita. Vanakker et al. describen, por ejemplo, los síndromes de delección 1q21, duplicación 7q11.23 o la duplicación 22q11.22. Esas alteraciones deberían ser analizadas cuidadosamente en el contexto de los hallazgos ecográficos y antecedentes familiares pertinentes, y siempre explicando en consulta de consejo genético las implicaciones de las mismas (pueden ser hereditarias y podrían no generar un fenotipo completo). En concreto, Vanakker et al. recomiendan solo informar de dichas alteraciones cuando existan hallazgos ecográficos (cardiopatía) compatibles con los mismos<sup>29</sup>.

### (iv) Hallazgo ecográfico sugerente de anomalía fetal no específica de un síndrome concreto

Las guías de trabajo internacionales vigentes (ACOG, y otras) son muy claras a la hora de orientar el estudio genético en caso de malformación ecográfica, indicando como procedimiento diagnóstico de primera línea el uso de microarrays para descartar cromosopatías y otras alteraciones submicroscópicas, cuando existe una malformación ecográfica mayor, entre las que puede incluirse el retraso de crecimiento intrauterino grave y precoz<sup>46–48</sup>. El estudio del cariotipo/QF-PCR se recomienda como un segundo paso (o en paralelo) para descartar otros eventos, ya sean reordenamientos, cromosomas marcadores supernumerarios o triploidías. Además, ante un hallazgo patológico de CMA, el cariotipo puede cobrar interés en el consejo genético.

Es importante señalar, no obstante, que, ante la aparición de una anomalía ecográfica mayor en el primer trimestre como la holoprosencefalia, onfalocelo, mielomeningocele, megavejiga, CIR precoz,

hidrops, anomalías placentarias, u oligoamnios, la sospecha inicial y más frecuente es la de una cromosomopatía, pudiendo comenzar dicho estudio con QF-PCR, dejando el CMA como técnica de segunda elección<sup>49,50</sup>. En caso de realización del cariotipo, podría llevarse a cabo un CMA en paralelo a dicho cariotipo para obtener un resultado más rápido.

En caso de un resultado negativo de los estudios genéticos, será preciso recabar otras evidencias clínicas (ecografía de precisión, etc.) para tratar de averiguar si existe un patrón ecográfico compatible con un síndrome o enfermedad concreta de origen genético, siguiendo las indicaciones del punto posterior.

### Conclusión

Con todo ello, el array-CGH es una técnica de enorme utilidad en el diagnóstico prenatal, aunque hay que tener en consideración las recomendaciones indicadas en el presente documento en cuanto a sus usos y limitaciones (tabla 1).

### Financiación

No se ha recibido fuente de financiación para la elaboración de la guía.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener un conflicto de intereses relacionado con el contenido de la guía.

### Autoría/colaboradores

J.S. coordinó el grupo de trabajo, escribió la propuesta y modificó todos aquellos aspectos de la guía que fueron solicitados por el grupo de trabajo y panel de expertos externos para su publicación.

I.L.E., grupo de trabajo del INGEMM, Grupo de genética prenatal del Hospital Clínico San Carlos, M.E.Q., R.M., E.C., LL.A., E.A., E.D.G. y M.J.T.T. formaron parte del grupo de trabajo, realizando las modificaciones necesarias al documento.

E.D.G. y M.J.T.T. formaron parte del grupo de trabajo y representaron la comisión de calidad de la AEGH.

J.R. actuó como representante de la SEGCD (sociedad invitada a la guía) y como miembro del grupo de trabajo.

J.G.P. y J.C.C. actuaron como representantes (presidentes) de la AEDP y la AEGH, respectivamente, así como revisores generales del contenido del documento.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los Dres. Antoni Borrell, Cristina González y Nerea Maiz su colaboración en la revisión del documento como expertos externos de acuerdo al protocolo AGREE II.

### Bibliografía

- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006;7:85–97.
- 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.
- Schaefer GB, Mendelsohn NJ. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med.* 2013;15:669.
- American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 581: The use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2013;122:1374–7.
- Cigudosa JC, Lapunzina P. (Coord). Consenso para la implementación de los Arrays [CGH y SNP-arrays] en la genética clínica. Instituto Roche: Madrid; 2012.
- Del Campo M, Plaja A, Casals E, Figueras F, de la Chica R, Armengol LI, et al. Recomendaciones para el uso clínico del microarray genómico en el diagnóstico prenatal. *Prog Obstet Ginecol.* 2015;58:470–3.
- Lejeune J, Gautier M, Turpin MR. Études des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad Sci (Paris).* 1959;248:302–3.
- Wolstenholme J, Rooney DE. Cytogenetics in the 1970 and 1980. *Prenat Diagn.* 2010;30:605–7.
- Cytogenetic guidelines and quality assurance. A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations [http://e-c-a.eu/].
- Tse KY, Leung WC, Leung KY, Lee CP, Ng LK, Lau ET, et al. Full karyotyping rapid aneuploidy diagnosis or both when invasive prenatal testing is performed for diagnosis of thalassaemia. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:55–9.
- Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn.* 2009;29:40–9.
- Bui TH, Vetro A, Zuffardi O, Shaffer LG. Current controversies in prenatal diagnosis 3: Is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era? *Prenat Diagn.* 2011;31:235–43.
- Lichtenbelt KD, Knoers NV, Schuring-Blom GH. From karyotyping to CMA in prenatal diagnosis. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135:241–50.
- Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER, et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37:6–14.
- 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.
- Fiorentino F, Caiazzo F, Napolitano S, Spizzichino L, Bono S, Sessa M, et al. Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: A prospective study on over 1000 consecutive clinical cases. *Prenat Diagn.* 2011;31:1270–82.
- Armengol L, Nevado J, Serra Juhé C, Plaja A, Mediano C, García-Santiago FA, et al. Clinical utility of chromosomal microarray analysis in invasive prenatal diagnosis. *Hum Genet.* 2012;131:513–23.
- ACOG Committee Opinion No. 446: Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2009;114:1161–3.
- Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012;367:2175–84.
- Janssen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Cobben JM, Odibo AO, Borrell A, et al. Array comparative genomic hybridization and fetal congenital heart defects: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45:27–35.
- Scott F, Murphy K, Carey L, Greville W, Mansfield N, Barahona P, et al. Prenatal diagnosis using combined quantitative fluorescent polymerase chain reaction and array comparative genomic hybridization analysis as a first-line test: Results from over 1000 consecutive cases. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:500–7.
- Srebniak M, Boter M, Oudesluijs G, Joosten M, Govaerts L, van Opstal D, et al. Application of SNP array for rapid prenatal diagnosis: Implementation, genetic counselling and diagnostic flow. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:1230–7.
- Malvestiti F, Agrati C, Grimi B, Pompili E, Izzi C, Martinoni L, et al. Interpreting mosaicism in chorionic villi: Results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis. *Prenat Diagn.* 2015;35:1117–27.
- Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:25–51.
- Vermeesch JR, Brady PD, Sanlaville D, Kok K, Hastings RJ. Genome-wide arrays: Quality criteria and platforms to be used in routine diagnostics. *Hum Mutat.* 2012;33:906–15.
- Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med.* 2013;15:478–81.
- Evangelidou P, Alexandrou A, Moutafi M, Ioannides M, Antoniou P, Koumbaris G, et al. Implementation of high resolution whole genome array CGH in the prenatal clinical setting: Advantages, challenges, and review of the literature. *Biomed Res Int.* 2013;2013:346762.
- Brady PD, delle Chiaie B, Christenhusz G, Dierickx K, van den Bogaert K, Menten B, et al. A prospective study of the clinical utility of prenatal chromosomal microarray analysis in fetuses with ultrasound abnormalities and an exploration of a framework for reporting unclassified variants and risk factors. *Genet Med.* 2014;16:469–76.
- Vanakker O, Vilain C, Janssens K, van der Aa N, Smits G, Bandelier C, et al. Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: The Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet.* 2014;57:151–6.
- AGREE Next Steps Consortium. El instrumento AGREE II. Versión electrónica. 2009 [consultado 16 Jun 2016]. Disponible en: <http://www.agreetrust.org>; Versión en español disponible en: <http://www.guiasalud.es>
- Association for Clinical Cytogenetics (UK). Professional guidelines for clinical cytogenetics-Prenatal diagnosis v1.0, 2009.
- Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: Ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ.* 1992;304:867–9.
- Lajeunesse G, Stadler A, Trombert B, Varlet MN, Patural H, Prieur F, et al. First-trimester cystic hygroma: Prenatal diagnosis and fetal outcome. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2014;43:455–62.

34. Azar GB, Snijders RJ, Gosden C, Nicolaides KH, et al. Fetal nuchal cystic hygromata: Associated malformations and chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther*. 1991;6:46–57.
35. Bahado-Singh RO, Wapner R, Thom E, Zachary J, Platt L, Mahoney MJ, et al. Elevated first-trimester nuchal translucency increases the risk of congenital heart defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192:1357–61.
36. Pandya PP, Kondyliou A, Hilbert L, Snijders RJ, Nicolaides KH, et al. Chromosomal defects and outcome in 1015 fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1995;5:15–9.
37. Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, Waters JJ, Nicolaides KH, et al. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: Observational study. *BMJ*. 2006;332:452–5.
38. Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, Petersen OB, et al. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;38:314–9.
39. Lund IC, Christensen R, Petersen OB, Vogel I, Vestergaard EM. Chromosomal microarray in fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45:95–100.
40. Hollis B, Mavrides E, Carvalho JS, Hill L, Dickinson V, Thilaganathan B. Significance of chromosome 22q11 analysis after detection of an increased first-trimester nuchal translucency. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;18:32–4.
41. Donnenfeld AE, Cutillo D, Horwitz J, Knops J. Prospective study of 22q11 deletion analysis in fetuses with excess nuchal translucency. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:508–11.
42. Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, et al. Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn*. 2010;30:995–9.
43. Huang J, Poon LC, Akolekar R, Choy KW, Leung TY, Nicolaides KH. Is high fetal nuchal translucency associated with submicroscopic chromosomal abnormalities on array CGH? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43:620–4.
44. Grande M, Jansen FA, Blumenfeld YJ, Fisher A, Odibo AO, Haak MC, et al. Genomic microarray in fetuses with increased nuchal translucency and normal karyotype: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;46:650–8.
45. Alamillo CM, Krantz D, Evans M, Fiddler M, Pergament E. Nearly a third of abnormalities found after first-trimester screening are different than expected: 10-year experience from a single center. *Prenat Diagn*. 2013;33:251–6.
46. Shaffer LG, Dabell MP, Rosenfeld JA, Neill NJ, Ballif BC, Coppinger J, et al. Referral patterns for microarray testing in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*. 2012;32:344–50.
47. Donnelly JC, Platt LD, Rebarber A, Zachary J, Grobman WA, Wapner RJ. Association of copy number variants with specific ultrasonographically detected fetal anomalies. *Obstet Gynecol*. 2014;124:83–90.
48. De Wit MC, Srebniak MI, Govaerts LC, van Opstal D, Galjaard RJ, Go AT. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: A systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43:139–46.
49. Witters G, van Robays J, Willekes C, Coumans A, Peeters H, Gyselaers W, et al. Trisomy 13, 18, 21, triploidy and Turner syndrome: The 5T's. Look at the hands. *Facts Views Vis Obgyn*. 2011;3:15–21.
50. Kurjak A, Kos M, Stipoljev F, Latin V, Funduk-Kurjak B, Kos M, et al. Ultrasonic markers of fetal chromosomal abnormalities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999;85:105–8.
51. Marzo Castillejo M, Viana Zulaica C. Calidad de la evidencia y grado de la recomendación. *Guías Clínicas*. 2007;7 Supl 1:6.