

Genetisk udredning ved infantile spasmer

Lars Kjærsgaard Hansen¹, Lilian Bomme Ousager², Rikke Steensbjerre Møller³, Peter V. Uldall⁴ & Helle Hjalgrim³

OVERSIGTSARTIKEL

1) HC Andersen Børnehospital, Odense Universitetshospital
2) Klinisk Genetisk Afdeling, Odense Universitetshospital
3) Forskningsenheden, Epilepsihospitalet, Dianalund
4) Neuropædiatrisk Ambulatorium, Rigshospitalet

RESUME

Infantile spasmer (IS) er symptomet på en svær epileptisk encefalopati. Det er af mange grunde vigtigt at afklare ætiologien til det enkelte barns sygdom. Når man ved et afpasset udredningsprogram for IS ikke har påvist en specifik ætiologi, bør sjældnere genetiske tilstande overvejes. Det anbefales primært at anvende *array*-baseret komparativ genomisk hybridiserings-undersøgelse. I artiklen præsenteres tilstande, hvor IS forekommer, og hvor det kan foretages specifikke genetiske test.

De senere års udvikling af genetiske undersøgelsesmetoder har givet muligheder for specifik diagnostik ved epileptiske syndromer, herunder infantile spasmer (IS) [1-3]. Formålet med denne artikel er at præsentere overvejelser ved genetisk udredning af IS.

MATERIALE OG METODER

Relevante artikler er fundet på PubMed (MEDLINE) ved brug af følgende søgekriterier alene eller i kombination: *infantile spasms, spasms, West syndrome, genetic, genetic testing, epilepsy, etiology, infancy and epileptic encephalopathy*.

BAGGRUND

IS er symptomet på en underliggende epileptisk encefalopati. Incidensen for IS er 1:2.000 børn, svarende til 20-30 nye tilfælde pr. år i Danmark [4-6]. Anfaldsmiologien (epileptiske spasmer (ES)) er en pludselig fleksion og/eller ekstension, primært i de proksimale eller trunkale muskler, evt. asymmetrisk. ES kommer typisk i serier, men kan forekomme enkeltvis. Kun ca. to tredjedele af patienterne har klassisk Westsyndrom



NØGLEPUNKTER

Infantile spasmer er en epileptisk encefalopati.

Årsagerne spænder vidt i det børneneurologiske felt.

Godt halvdelen af børnene får en ætiologisk diagnose ved en standardundersøgelsesplan.

Hvis et passende undersøgelsesprogram, hvor også magnetisk resonans-skanning er væsentlig, ikke har givet en ætiologisk afklaring, foreslår vi først *array*-komparativ genomisk hybridisering og dernæst med fokus på klinikken og barnets køn nogle få genetiske test som beskrevet.

med triaden: ES, hypsarytmi ved elektroencefalografi og tab/stagnation i psykomotorisk udvikling [7, 8]. I omkring 60% af IS-tilfældene kan man fastlægge en ætiologi [9]: tuberøs sklerose (TS) 7%, cerebrale malformationer 8%, kromosomfejl 8%, cerebralt infarkt 8%, hypoksisk-iskæmisk encefalopati 10%, periventriculær leukomalaci/hæmoragi 5% og andre kendte årsager 15%. Ætiologien er vigtig af hensyn til behandling af og prognose for patienterne, som spænder fra de 10-20%, der ikke får kognitive senfølger, til den store gruppe, der får svær mental retardering [1, 5, 10, 11]. Blandt børn med uforklarede IS kan man med intensiveret diagnostik, specielt genetisk testning, herunder *array*-baseret komparativ genomisk hybridisering (CGH), afklare en væsentlig andel [2, 3, 12]. I artiklen omtales genetiske tilstande, som kan overvejes, hvis et udredningsprogram, der er tilpasset de kliniske fund, ikke har givet en specifik diagnose.

GENETISKE UNDERSØGELSER

Der findes endnu ikke specifikke undersøgelsespaneler for genetiske årsager til IS [12]. Test for visse andre svære epilepsier i tidlig barnealder, f.eks. Dravets syndrom, *protocadherin 19*-mutation og glukose-transportdefekt 1, er ikke interessante her, da der i praksis ikke ses IS ved disse tilstande [13, 14]. IS i sammenhæng med andre symptomer kan give fingerpeg om, hvilken tilstand der bør undersøges for.

Infantile spasmer ved større kromosomfejl og mikrodeletionssyndromer

Epilepsi forekommer hos 5-10% af personerne med Downs syndrom, og i ca. halvdelen af tilfældene er der tale om IS som første anfaldstype [15]. Tidlig debuterende epilepsi er et kendetegn for 1p36-deletions-syndrom, hvor der hos omkring 60% af patienterne vil udvikles epilepsi med IS som den hyppigste anfaldstype [16]. Patienter med 15q-inversions-duplikations-syndrom har ligeledes en overhyppighed af epileptiske anfald og IS [17]. Williams syndrom (WS) er et *contiguous gene*-syndrom, mikrodeletionssyndrom på kromosom 7. De færreste med WS har IS, men når de har det, vil hele sygdomsbilledet fremstå sværere. Her vil der ofte være tale om deletioner, som strækker sig længere distalt på kromosom 7, og som medinddrager genet *MAGI2*. I et studie har man påvist, at 15 ud af 16 personer med WS og IS/epilepsi

havde en deletion, der inkluderede *MAGI2* [18] (Tabel 1). Supplerende *array*-CGH-undersøgelse vil her være indiceret. Også ved andre mindre velbeskrevne kromosomforandringer ses der IS, og *array*-CGH vil være et rimeligt førstevalg, hvis ikke den generelle udredning peger på et specifikt syndrom.

Infantile spasmer ved neurokutane syndromer

Hyppigheden af TS blandt børn med IS varierer i studier fra 7% [9] til omkring 25% [6, 8]. IS kan være den første anfaldstype. Epilepsien skyldes cerebrale tubera. På computertomografi ses der ofte karakteristiske forkalkede subependymale noduli. Der kan i de fleste tilfælde påvises mutation i *TSC1* eller *TSC2*. I omkring en tredjedel af tilfældene er der tale om en nedarvet autosomal dominant mutation. Der ses generelt stor variation i graden af symptomer, og omkring 10% har ikke åbenbare symptomer. Ved neurofibromatose ses en 15 gange øget hyppighed af IS [19], ligesom hyppigheden er øget ved Sturge-Webers syndrom.

Ved pigmentmosaicisme, hvilket er en neurokutan kromosomfejl i mosaikform som f.eks. Pallister-Killians syndrom, kan der ses IS [9, 20-22]. Afhængigt af hvilke kimlag, som indgår i mosaikformen, kan kromosomanalyse på blod vise normale resultater, og fibroblastkultur fra dyspigmenteret hud er derfor vigtig [23].

Infantile spasmer ved metaboliske sygdomme

Metaboliske sygdomme er ikke hyppige blandt børn med IS [9]. Dog kan en del af disse medføre IS: fenylketonuri, bioproteinmangel og pyridoxinmangel [8, 9], men ofte vil andre neurologiske symptomer dominere [24]. Pyridoxinafhængige kramper skyldes mutationer i *ALDH7A1* (antikvitin)-genet [25]. Anfaldene begynder ofte inden for de første levetimer, og



TABEL 1

De hyppigste kromosomale forandringer, der er associeret med infantile spasmer.

Kromosom	Syndrom	Kandidatgen/gener
Trisomi 21	Downs syndrom	-
1p36	1p36-deletions-syndrom	-
7q11.23-q21.1	7q11.23-q21.1-deletions-syndrom	<i>MAGI2</i>
15q11q13	15q-inversion-duplikations-syndrom	-
12p-mosaik-tetrasomi	Pallister-Killians syndrom	-
17p13.3	Miller-Diekers syndrom	<i>PAFAH1B1</i> (<i>LIS1</i>)

90% af patienterne debuterer i første måned, men hos få sker det senere (op til to år). Børn debuterer ofte med langvarige anfald og gentagne status epilepticus-episoder. Der ses forskellige anfaldstyper inkl. IS, men IS vil sjældent være den første anfaldstype. Diagnosen kan indikeres af forhøjet pipekolsyre i urin og serum. Mutation i *PNPO* (pyridoxinfosfotoxidase)-genet og pyridoxalfosfatbehandling bør overvejes ved manglende effekt af pyridoxin [26].

Infantile spasmer ved andre genetisk betingede tilstande

Menkes *kinky hair*-syndrom, der udelukkende forekommer hos drenge, ledsages meget ofte af IS. Syndromet skyldes en kobbertransporterende adenosintrifosfat (ATP)-ase defekt (*ATP7A*-genet), og diagnostisk er hårmikroskopi og måling af serumkobberniveau vejledende [27].

Ved abnormitet påvist ved magnetisk resonansskanning og ledsagende klinisk syndrom kan genetisk undersøgelse i visse tilfælde give en ætiologisk forklaring. Det gælder for forskellige former for lissencefali: f.eks. ved *LIS1*-mutation (klassisk, isoleret lissencefali



TABEL 2

De hyppigste monogene årsager til infantile spasmer.

Gen	Kromosom	Laboratorium, der laver analysen	Genprodukt/funktion	Arvegang	Køn	Fænotype
<i>TSC1</i>	9q34.13	Klinisk Genetisk Afdeling, Rigshospitalet	Tumorsuppressor	Autosomal dominant ca. 70% de novo	Begge køn	Infantile spasmer, cerebrale subependymale, subkortikale og/eller periventriculære tubera, pigmentforandringer i huden
<i>TSC2</i>	16p13.3	Kennedy Centret	Tumorsuppressor	Autosomal dominant ca. 70% de novo	Begge køn	Infantile spasmer, cerebrale subependymale, subkortikale og/eller periventriculære tubera, pigmentforandringer i huden
<i>ARX</i>	Xp21.3	Kennedy Centret	Transkriptionsfaktor	X-bundet recessiv	Drenge	Tidligt indsættende epileptisk encefalopati, mental retardering
<i>CDKL5</i>	Xp22.13	Klinisk Genetisk Afdeling, Rigshospitalet	Ser/Thr-proteinkinase	X-bundet dominant	Piger	Tidligt indsættende intraktable epilepsi og en klinisk fremtoning, som minder om Retts syndrom
<i>STXBP1</i>	9q34.11	Flere udenlandske laboratorier ^{a)}	Syntaxinbindingsprotein	Autosomal dominant	Begge køn	Tidligt indsættende epileptisk encefalopati, hypotoni, mental retardering, hypomyelinisering

a) Kontakt evt. nærmeste genetiske afdeling for hjælp til at finde relevant laboratorium.



DNA.

og Miller-Diekers syndrom), *DCX*-mutation (dobbelcortex) og mutation i bl.a. *POMT1* ved Walker-Warburgs syndrom/*muscle-eye-brain syndrome* [28]. Endnu uden påvist genetisk årsag ses der hos piger Aicardis syndrom med IS, specifikke defekter i retina, mental retardering og corpus callosum agenesi [29].

Kønsbunden periventrikulær nodulær heterotopi er en radial migrationsdefekt, der medfører, at grå substans placeres som øer langs lateralventriklerne. Det skyldes mutationer i filamin A-genet (*FLNA*). De heterozygote kvinder kan evt. have nogen mental retardering, hjertemisdannelse og epilepsi fra ungdomsårene; drengefostre dør oftest intrauterint, men de, som overlever, kan have IS og udviklingshæmning [30].

Udvalgte enkeltgensygdomme med infantile spasmer

Aristaless-related homeobox gen

Mutationer i *aristaless-related homeobox*-genet (*ARX*) bevirker en række forskellige syndromer hos drenge, hvor der kan ses markante intrafamiliar forskelle. Der ses familiar X-bundet syndromal og nonsyndromal mental retardering, X-bundet IS, dystoni, spasticitet, lissencefali, corpus callosum-agenesi og abnorme genitalier, benævnt ved en række eponymer (Tabel 2) [31].

Cyclin-dependent kinase-like 5

Cyclin-dependent kinase-like 5 (*CDKL5*)-mutationer medfører encefalopati hos piger, der har behandlingsrefraktær epilepsi med IS, hypotoni og en fænotype, der efter de første år minder om Retts syndrom. Til forskel fra patienter med Retts syndrom vil pigerens udvikling været påvirket fra fødslen. Epilepsien debuterer typisk i 3-4 måneders-alderen. Anfaldene kan i begyndelsen være toniske, stridor, grimasser



FAKTABOKS

Udvalg af undersøgelser ved infantile spasmer

Magnetisk resonans-skanning

Computertomografi

Hæmatologi, syre-base, glukose, calcium, ammoniak, urat, laktat, kreatininkinase, kreatinin, levertal, serumkobber, ceruloplasmin, udvidet fenylketonuriscreeening, TORCH-titer (toksoplasmose, rubella, cytomegalovirus, herpes)

Dermatologisk vurdering

Oftalmologisk vurdering

Urinmetabolisk screening

Blodaminosyreprofil med pipekolsyre

lysosomale enzymer

Array-komparativ genomisk hybridisering

VLCFA (meget langkædede fedtsyrer)

Karbohydrat-deficient-glykoprotein-syndrom

Spinalpunktur: celler, glukose, laktat, protein, aminosyreprofil

Hudbiopsier med kromosomanalyse

og senere IS. *CDKL5*-mutationer forekommer hos 9% af de piger, der har tidligt indsættende intractable anfald [3, 32, 33].

Syntaxinbindende protein 1

Mutationer i syntaxinbindende protein 1 (*STXBPI*) kan ses i op til 10% af tilfældene med uforklarede og uklassificerede epileptiske encefalopatier i de første leveår. Klinikken kan være blandet, og nogle har IS [34]. *STXBPI*-mutationer kan i øvrigt særligt overvejes ved Othahas syndrom [8, 34].

SUCLA2

Encefalomyopatisk mitokondrielt DNA-depletionsyndrom med mild metylmalonaciduri skyldes mutationer i *SUCLA2*, der også kan medføre IS og tidlig svær encefalopati [35]. Der er en høj bærerfrekvens på 1:33 blandt færinger, og mutationer er også påvist hos andre etniske grupper.

DISKUSSION

Når et barn får IS, kan det være afgørende for forældrene at få klarlagt årsagen hertil. Kendskab til årsagen til barnets sygdom vides at hjælpe forældrene gennem en vanskelig tilpasningsproces, hvor accept er afgørende for det nye liv med et handicappet barn [36]. Ny viden om genetiske årsager til IS og tidlig epileptisk encefalopati publiceres stadig oftere [37] og er vigtig viden for klinikerne. International League Against Epi-



FAKTABOKS

Klassisk kromosomanalyse

Er førstevalg ved mistanke om antalsmæssige kromosomforandringer eller større strukturelle forandringer.

Opløselighed 3-10 Mb.

Kan anvendes ved mistanke om mosaiktilstand.

Ved mistanke om konkret *mikrodeletion* kan anvendes fluorescerende in situ-hybridisering eller *multiplex ligation dependent-amplifikation*-undersøgelser (f.eks. ved mistanke om 1p36-deletionsyndrom).

Array-baseret komparativ genomisk hybridisering

En metode til at diagnosticere små og store kvantitative ændringer i genomet (genomisk ubalance, dvs. deletioner og duplikationer).

Opløseligheden er langt større end ved den almindelige kromosomundersøgelse (ned til ~ 30 kb).

Man ser ikke balancerede translokationer og kan ikke være sikker på at identificere mosaiktilstande.

lepsy (ILAE) foreslog i 2010 en ny klassifikation af epileptiske syndromer, hvor der tages særligt hensyn til ætiologi og forankring i genetiske forhold samt neuro-radiologisk afklaring af læsionelle årsager [38]. Ved påvisningen af en specifik genetisk årsag kan man vurdere gentagelsesrisikoen og dermed give familierne mulighed for at planlægge i forhold til evt. kommende børn. Ældre børn og voksne tidligere uafklarede IS kan komme i fokus igen, og prognosen kan beskrives med større sikkerhed. Samtidig vil en tidlig, specifik diagnose mindske den samlede sum af diagnostiske undersøgelser og procedurer, hvilket er til gavn for både patienten, dennes familie og sundhedsøkonomien. Overvejelser om epilepsikirurgi kan blive mere velbegrundede. En tidlig viden om et genetisk epilepsisyndrom bør ikke forhindre vaccinationer, da der ikke er holdpunkt for en dårligere prognose, selvom den prædestinerede epilepsi kan debutere tidligere [39, 40].

KONKLUSION

Det er en udfordring for klinikerne at diagnosticere den specifikke årsag til IS. Primært må der ses bredt på årsagsmulighederne. Patientens køn afgør i nogen grad, hvilke syndromer der er relevante: Flere af sygdommene synes at være koblet til X-kromosomet (*CDKL5*, *FLNA*), hvilket kan betyde, at drengestofre dør, så der blandt patienterne næsten kun ses piger. I andre tilfælde er drengene syge, og pigerne er enten raske eller kun let symptombærende (*DCX*, *ARX*). De genetiske syndromer kan have specifikke fænotyper som f.eks. ved *CDKL5*-forandringer, men ofte er der tale om en epileptisk encefalopati med IS som fælles-symptom og herudover kun beskedne eller uspecifikke kliniske forskelle. I disse situationer ville det være ønskeligt, at der kunne sammensættes relevante genetiske undersøgelsespaneler for IS, så man hurtigere kunne nå frem til en evt. genetisk diagnose. Med stigende anvendelse af nyere metoder til DNA-sekventering (*next generation sequencing*) må det forventes, at det vil komme i en ikke så fjern fremtid, men indtil videre vil vi anbefale *array*-CGH som første genetiske screeningsundersøgelse.

KORRESPONDANCE: Lars Kjærsgaard Hansen, HC Andersen Børnehospital, Odense Universitetshospital, Sdr. Boulevard 29, 5000 Odense. E-mail: lars.kjaersgaard@dadlnet.dk

ANTAGET: 1. december 2011

FØRST PÅ NETTET: 6. februar 2012

INTERESSEKONFLIKTER: ingen

LITTERATUR

- Reid CA, Jackson GD, Berkovic SF et al. New therapeutic opportunities in epilepsy: a genetic perspective. *Pharmacol Ther* 2010;128:274-80.
- Ottman R, Hirose S, Jain S et al. Genetic testing in the epilepsies – report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia* 2010;51:655-70.
- Deprez L, Jansen A, De Jonghe P. Genetics of epilepsy syndromes starting in the first year of life. *Neurology* 2009;72:273-81.
- Trevathan E, Murphy CC, Yeargin-Allsopp M. The descriptive epidemiology of infantile spasms among Atlanta children. *Epilepsia* 1999;40:748-51.
- Luthvigsson P, Olafsson E, Sigurtharsdottir S et al. Epidemiologic features of infantile spasms in Iceland. *Epilepsia* 1994;35:802-5.
- Primec ZR, Kopac S, Neubauer D. Epidemiologic features of infantile spasms in Slovenia. *Epilepsia* 2002;43:183-7.
- Carballo RH, Ruggieri V, Gonzalez G et al. Infantile spasms without hypsarrhythmia: a study of 16 cases. *Seizure* 2011;20:197-202.
- Dulac O, Tuxhorn I. Infantile spasms and West syndrome. I: Roger J, Bureau M, Dravet C et al, red. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. Montrouge: John Libbey Eurotext, 2005:53-88.
- Osborne JP, Lux AL, Edwards SW et al. The underlying etiology of infantile spasms (West syndrome): information from the United Kingdom Infantile Spasms Study (UKISS) on contemporary causes and their classification. *Epilepsia* 2010;51:2168-74.
- Delgado-Escueta AV, Bourgeois BF. Debate: does genetic information in humans help us treat patients? PRO-genetic information in humans helps us treat patients. CON-genetic information does not help at all. *Epilepsia* 2008;49:13-24.
- Karvalas G, Lortie A, Scantlebury MH et al. A retrospective study on etiology based outcome of infantile spasms. *Seizure* 2009;18:197-201.
- Pal DK, Pong AW, Chung WK. Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nature Rev Neurol* 2010;6:445-53.
- Leen W, Klepper J, Verbeek MM et al. Glucose transporter-1 syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable deficiency disorder. *Brain* 2010;133:655-70.
- Marini C, Mei D, Parmeggiani L et al. Protocadherin 19 mutations in girls with infantile-onset epilepsy. *Neurology* 2010;75:646-53.
- Arya R, Kabra M, Gulati S. Epilepsy in children with Down syndrome. *Epileptic Disord* 2011;13:1-7.
- Bahi-Buisson N, Guttierrez-Delgado E, Soufflet C et al. Spectrum of epilepsy in terminal 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia* 2008;49:509-15.
- Battaglia A. The inv dup(15) or idic(15) syndrome: a clinically recognisable neurogenetic disorder. *Brain Dev* 2005;27:365-9.
- Marshall CR, Young EJ, Pani AM et al. Infantile spasms is associated with deletion of the MAGI2 gene on chromosome 7q11.23-q21.11. *Am J Hum Genet* 2008;83:106-11.
- Ruggieri M, Iannetti P, Clementi M et al. Neurofibromatosis type 1 and infantile spasms. *Childs Nerv Syst* 2009;25:211-6.
- Cerminara C, Compagnone E, Bagnolo V et al. Late-onset epileptic spasms in children with Pallister-Killian syndrome: a report of two new cases and review of the electroclinical aspects. *J Child Neurol* 2010;25:238-45.
- Küster W, König A. Hypomelanosis of Ito: no entity, but a cutaneous sign of mosaicism. *Am J Med Genet* 1999;85:346-50.
- Hansen LK, Bygum A, Krogh LN. Infantile spasms and pigmentary mosaicism. *Epilepsia* 2010;51:1317-8.
- Happle R. Phylloid hypermelanosis: an unusual form of pigmentary mosaicism. *Dermatology* 2010;220:183-5.
- Vigevano F, Bartuli A. Infantile epileptic syndromes and metabolic etiologies. *J Child Neurol* 2002;17:359-13.
- Mills PB, Footitt EJ, Mills KA et al. Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency). *Brain* 2010;133:2148-59.
- Hoffmann GF, Schmitt B, Windfuhr M et al. Pyridoxal 5'-phosphate may be curative in early-onset epileptic encephalopathy. *J Inher Metab Dis* 2007;30:96-9.
- Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet* 2010;18:511-8.
- Guerrini R. Genetic malformations of the cerebral cortex and epilepsy. *Epilepsia* 2005;46:32-7.
- Aicardi J. Aicardi syndrome. *Brain Dev* 2005;27:164-71.
- Masruha MR, Caboclo LO, Carrete H Jr et al. Mutation in filamin A causes periventricular heterotopia, developmental regression, and West syndrome in males. *Epilepsia* 2006;47:211-4.
- Shoubridge C, Fullston T, Gécz J. ARX spectrum disorders: making inroads into the molecular pathology. *Hum Mutat* 2010;31:889-900.
- Mei D, Marini C, Novara F et al. Xp22.3 genomic deletions involving the CDKL5 gene in girls with early onset epileptic encephalopathy. *Epilepsia* 2010;51:647-54.
- Nemos C, Lambert L, Guiliano F et al. Mutational spectrum of CDKL5 in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature. *Clin Genet* 2009;76:357-71.
- Otsuka M, Oguni H, Liang JS et al. STXB1 mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome – result of Japanese cohort study. *Epilepsia* 2010;51:2449-52.
- Ostergaard E. SUCLA2-related mitochondrial DNA depletion syndrome, encephalomyopathic form, with mild methylmalonic aciduria. I: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR et al, red. *Gene reviews*. Seattle: University of Washington, 1993-2009.
- Graungaard AH. How do they manage? *Ugeskr Læger* 2007;169:829.
- Kurian MA, Meyer E, Vassallo G et al. Phospholipase C beta 1 deficiency is associated with early-onset epileptic encephalopathy. *Brain* 2010;133:2964-70.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010;51:676-85.
- Berkovic SF, Harkin L, McMahon JM et al. De novo mutations of the sodium channel gene SCN1A in alleged vaccine encephalopathy: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2006;5:488-92.
- McIntosh AM, McMahon J, Dibbens LM et al. Effects of vaccination on onset and outcome of Dravet syndrome: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2010;9:592-8.