

Kromosomfejl hos mentalt retarderede og dysmorfe patienter med normal karyotype

Cand.scient. Maria Kirchhoff, cand.scient. Søren Pedersen, overlæge Eigil Kjeldsen, bioanalytiker Hanne Rose, cand.scient. Morten Dunø, professor Steen Kølvrå & overlæge Claes Lundsteen†

H:S Rigshospitalet, Juliane Marie Centret, Klinisk Genetisk Afdeling, og Århus Universitetshospital, Århus Sygehus, Klinisk Genetisk Afdeling

Resumé

Introduktion: Formålet med studiet var at sammenligne antallet og typen af kromosomfejl påvist med henholdsvis subtelomerfluorescens in situ-hybridisering (FISH) og højopløsnings komparativ genomisk hybridisering (HR-CGH) hos mentalt retarderede og dysmorfe patienter med normal karyotype.

Materiale og metode: I alt 94 patienter blev undersøgt med begge metoder, mens yderligere 330 patienter blev undersøgt med HR-CGH alene. Påviste kromosomfejl blev bekræftet med en anden teknik og deres oprindelse blev undersøgt.

Resultater: Der blev fundet i alt ni kromosomfejl med både HR-CGH og subtelomer FISH. Otte blev fundet med HR-CGH, tre med subtelomer FISH og to med begge teknikker. Hos i alt 424 patienter blev der med HR-CGH fundet 51 kromosomfejl (12%). De fleste kromosomfejl var små interstitielle deletioner, som ikke kan påvises ved screening med andre cytogenetiske teknikker.

Diskussion: HR-CGH-analyse anbefales til undersøgelse af mentalt retarderede og dysmorfe patienter med normal karyotype og bør anvendes før subtelomer-FISH-undersøgelse, idet det diagnostiske udbytte er størst ved førstnævnte metode. I familiære tilfælde, hvor risikoen for translokationer er stor, bør subtelomer-FISH derimod anvendes før HR-CGH, da førstnævnte teknik har den største følsomhed for undersøgelse af kromosomernes terminale regioner.

Mental retardering er en hyppig lidelse, og årsagen er ukendt i ca. halvdelen af tilfældene.

Imidlertid har de senere års anvendelse af molekylær cytogenetik vist, at submikroskopiske kromosomfejl kan være forbundet med mental retardering [1]. I de fleste undersøgelser har man anvendt teknikker, hvor kromosomernes subtelomerområder screenes for kromosomfejl, idet disse områder indeholder mange gener og ofte er involverede i kromosomrearrangementer [2-10]. Det er imidlertid også velkendt, at interstitielle kromosomfejl kan være årsag til mental retardering.

Højopløsningskomparativ genomisk hybridisering (HR-CGH) er en teknik til screening af hele genomet. Vi har tidligere anvendt metoden til undersøgelse af mentalt retarderede

og dysmorfe patienter med normal konventionel karyotype [11, 12]. Ved hjælp af dynamiske standardreferenceintervaller i stedet for faste grænser [13] giver HR-CGH en tre gange højere følsomhed end konventionel CGH [14]. Den forbedrede CGH-teknik viste sig at være velegnet til undersøgelse af denne type patienter, idet kromosomfejl blev påvist hos 11% [12]. De fleste af disse kromosomfejl var interstitielle.

Det har tvivlsom værdi at sammenligne disse resultater med resultater fra tilsvarende subtelomerundersøgelser, idet detektionsraten er stærkt afhængig af den strategi, der anvendes ved udvælgelse af patienter. Screening af subtelomerområder med FISH-prober kan foretages med stor følsomhed, men er begrænset til kromosomernes terminale dele. I modsætning hertil opnås med HR-CGH en screening af hele genomet, om end med ringere følsomhed. Med henblik på at afgøre, i hvilken grad de to teknikker kan bidrage til at afsløre submikroskopiske kromosomfejl hos mentalt retarderede og dysmorfe patienter med normal konventionel karyotype, gennemførte vi en prospektiv undersøgelse af 94 patienter. Alle patienter fik foretaget både subtelomer-FISH og HR-CGH-analyse i en blindet undersøgelse. Resultaterne viste, at der med HR-CGH kunne afsløres flest kromosomfejl, og at de fleste kromosomfejl var interstitielle. I denne artikel fremlægges der endvidere resultater af endnu 330 HR-CGH-analyser foretaget på samme indikation som i den prospektive undersøgelse. Resultaterne viser, at HR-CGH-undersøgelse bør tilbydes før subtelomer-FISH-undersøgelse, idet anvendelse af den førstnævnte teknik giver størst diagnostisk udbytte. Undertaget herfra kunne være patienter, hvor der er andre berørte familiemedlemmer. Sandsynligheden for, at en translokation er involveret i sådanne tilfælde er stor, og med subtelomer-FISH undersøges kromosomernes terminale dele med større følsomhed, end de gør med HR-CGH.

Materiale og metoder

I alt 94 patienter blev undersøgt med både HR-CGH (Rigshospitalet) og subtelomer-FISH (Århus Universitetshospital) i en prospektiv undersøgelse. Indgangskriterier: 1) alder: 0-10 år, 2) normal graviditet og fødsel, 3) klinisk billede: psykomotorisk retardering og kromosomstigmata defineret som et eller flere af følgende: vækstretardering, dysmorfe træk, indre misdannelser, eksempelvis af hjerte, nyrer eller CNS, 4) normale forhold ved kromosomundersøgelse, 5) skriftligt tilsagn fra forældre om deltagelse efter information. Udelukkelseskriterier: fastslået ikkekromosomal diagnose. Alle patienter var henvist fra børneafdelinger i Danmark. Prøver blev modtaget som blodprøver eller oprenset DNA. Der blev ikke udvekslet

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

Tabel 1. Kromosomfejl påvist hos 94 mentalt retarderede og dysmorfe patienter ved anvendelse af HR-CGH og subtelomer-FISH.

Patient nr.	Højopløsnings-komparativ genomisk hybridisering	Subtelomerer fluorescens in situ-hybridisering (FISH)	Efterfølgende bekræftet med			
			G-bånd	FISH	kvantitativ polymerase-kædereaktion	Parental oprindelse
<i>Duplikationer</i>						
1	enh(1q21q21)		Ja			De novo
2	enh(5q13q15)		Ja			De novo
<i>Deletioner</i>						
3	dim(3q23q23)				Ja	De novo
4	dim(3q25q26)		Ja			De novo
5	dim(10q25q25)		Ja			De novo
6	dim(17p11p12)		Ja	Ja		De novo
7	dim(22q13→qte)	del(22)(qtel)(D22S1726×1)			Ja	De novo
8		del(22)(qtel)(D22S1726×1)			ja	De novo
<i>Translokationer</i>						
9	enh(7p22→pter)	del(4)(ptel)(D4S3360×1) dup(7)(ptel)(G3141×3)			Ja	De novo

Dim: reduceret fluorescensratiointensitet ~ deletion. Enh: forøget fluorescensratiointensitet ~ duplikation.

resultater mellem laboratorierne i København og Århus, før alle resultater forelå.

De øvrige 330 mentalt retarderede og dysmorfe patienter, der er beskrevet i denne oversigt, blev henvist til Rigshospitalet til rutine HR-CGH-analyse.

HR-CGH

Princippet for HR-CGH har været beskrevet tidligere [15].

Fremgangsmåde

CGH blev udført som tidligere beskrevet [13]. Kort fortalt blev patient-DNA og normalt reference-DNA mærket med henholdsvis FITC-2-dUTP og Texas Red-5-dUTP (Dupont, Boston, MA, USA). I alt 400-800 ng af hvert mærket DNA og 20-30 µg Cot1-DNA blev hybridiseret til normale metafase-kromosomer. Præparaterne blev hybridiseret i 3-4 dage, vasket og farvet med 4,6-diamidino-2-phenylindol. CGH-billeder blev optaget via en CytoVision-computer (Applied Imaging Corporation, Newcastle, UK) forbundet med et DM RBE-fluorescensmikroskop (Leica, Heerbrugg, Schweiz) og siden overført til og analyseret på et Magiscan billedanalyse-system (Applied Imaging Corporation, Newcastle, UK) eller direkte på CytoVision*. For hver patient blev ti metafaser analyseret. Ratioprofiler blev evalueret på grundlag af 99,5% dynamiske standardreferenceintervaller [13]. Reference-DNA til CGH-analyse stammede fra perifert blod fra karyotypisk normale mænd og kvinder. Højmolekylært genomisk DNA blev oprenset på Qiagen Genomic Tip Søjle (Qiagen, Hilden, Tyskland) eller med Puregene DNA-isolationskit (Puregene, Gen- tra Systems; Minneapolis, USA).

Subtelomer-fluorescens in situ-hybridisering

Fluorescens in situ-hybridisering-undersøgelse af alle 41 subtelomerregioner blev udført i et trin ved anvendelse af Chromo- probe Multiprobe T-system ifølge fabrikantens instruktion

(Cytocell, Oxford, UK). Billeder af hybridiserede metafaser blev optaget med et Photometrics Sensus CCD kamera og analyseret med IPLab Spectrum software (Scanalytics Inc., Fairfax, USA). Mindst tre metafaser blev undersøgt for hvert kromosom. I prøver med positivt resultat blev der lavet separat FISH-analyse for den mistænkte region med samme probe enten på et nyt Multiprobe-T-system præparat eller med Aquarius telomer-specifikke prober (Cytocell, Oxford, UK).

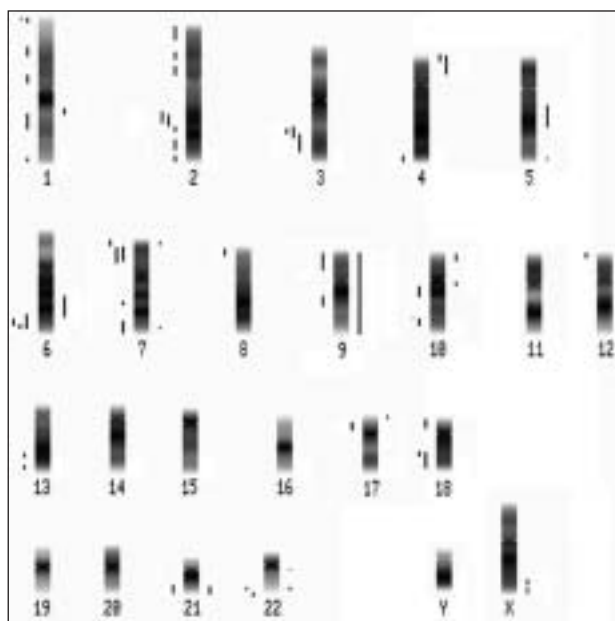
Resultater

I den prospektive undersøgelse blev 94 mentalt retarderede og/eller dysmorfe patienter med normal konventionel karyo- type undersøgt med både subtelomer-FISH og HR-CGH. Som det fremgår af **Tabel 1**, blev der fundet ni kromosomfejl; tre med subtelomer FISH, otte med HR-CGH og to med begge teknikker. **Figur 1** viser kromosomfejl fundet ved HR-CGH i den prospektive undersøgelse samt i yderligere 330 ru- tine-HR-CGH-analyser foretaget på samme indikation. I alt blev der fundet kromosomfejl hos 51 ud af 424 patienter (12%). Halvtreds kromosomfejl var strukturelle. Af disse var ni duplikationer, 34 deletioner og syv translokationer. Fireog- tredive kromosomfejl var interstitielle, mens 16 var terminale.

På nær et enkelt tilfælde hvor yderligere prøvemateriale ikke var tilgængeligt, kunne alle kromosomfejl bekræftes med en anden teknik. Forældre til patienter med kromosomfejl blev undersøgt med HR-CGH, FISH eller kvantitativ poly- merasekædereaktion, hvis prøvemateriale var tilgængeligt. I fire tilfælde havde en forælder en balanceret translokation, og i seks tilfælde havde en forælder en kromosomfejl svarende til barnets. For fire patienter var prøvemateriale fra den ene eller begge forældre ikke tilgængeligt, mens kromosomfejlene for resten af patienternes vedkommende var nyopståede.

Diskussion

I de senere år har forbedringer af molekylær-cytogenetiske



Figur 1. Enoghalvtreds kromosomfejl påvist hos 424 mentalt retarderede og dysmorfe patienter ved anvendelse af højopløsningskomparativ genomisk hybridisering (HR-CGH). Duplikationer og deletioner er vist som sorte streger på henholdsvis højre og venstre side af de 4,6-diamidino-2-phenylindol-farvede kromosomer. Af tekniske årsager er stregerne længde større end den reelle størrelse af kromosomfejlene.

teknikker tilvejebragt bevis for, at submikroskopiske kromosomfejl er en væsentligt årsag til mental retardering. Eftersom man ikke med nogen af de teknikker, der er til rådighed til at påvise sådanne kromosomfejl, kan screene hele genomet med meget høj følsomhed, er det vigtigt at opklare, hvilke undersøgelser der vil være mest udbytterige for en bestemt type patienter.

I nærværende undersøgelse har vi derfor sammenlignet anvendelse af subtelomer-FISH og HR-CGH til udredning af mentalt retarderede og dysmorfe patienter med normal konventionel karyotype. Ved anvendelse af begge teknikker blev der i alt fundet ni kromosomfejl blandt 94 patienter. Kun en kromosomfejl blev udelukkende påvist ved subtelomer-FISH, mens seks blev påvist ved HR-CGH alene. De to teknikker komplementerede således hinanden, men resultaterne peger på, at HR-CGH bør tilbydes før subtelomer-FISH. Undtaget herfra kunne være patienter, der har andre mentalt retarderede i familien. Translokationer indgår ofte i sådanne tilfælde, og med FISH-metoden vil man kunne påvise flere af disse end med HR-CGH pga. førstnævnte metodes større følsomhed.

Vi har med HR-CGH undersøgt yderligere 330 mentalt retarderede og dysmorfe patienter med normal konventionel karyotype. Hos de i alt 424 patienter blev der fundet 51 kromosomfejl (12%). En detektionsrate på 12% synes at være ganske høj, specielt i betragtning af, at nogle af patienterne kun var retarderede i mild grad, og nogle havde ingen eller meget lette dysmorfe træk. Detektionsraten er dog også i nogen grad afhængig af kvaliteten af de forudgående G-båndanalyser. Tilsvarende resultater er fundet i et mindre studie [16], hvor

der med HR-CGH blev fundet fem kromosomfejl hos 50 patienter med tilsvarende klinisk billede.

For nogle af de kromosomfejl, der blev påvist, er det uvist, om de er patogene. Dette kan først afklares, når de pågældende kromosomregioner er blevet karakteriseret nærmere, eller flere patienter med samme kromosomfejl er identificeret. For at kunne vurdere den kliniske betydning af HR-CGH-fundene anvendte vi en followupstrategi med hurtig verificering med en anden teknik samt undersøgelse af forældre. Vi anvender molekylære teknikker for yderligere at karakterisere kromosomfejlene med hensyn til præcis placering, hvilket er yderst vigtigt, når man ønsker at sammenligne individuelle tilfælde, og nødvendigt når man vil kortlægge de gener, der kan have betydning for det kliniske billede. Endelig forsøger vi via litteratur, databaser og samarbejdspartnere på andre cytogenetiske laboratorier at identificere andre patienter med lignende fænotyper og/eller kromosomfejl i samme kromosomregioner som vores patienter.

Det er afgørende for familien, børnelægen og den kliniske genetiker, at et mentalt retarderet barn bliver diagnosticeret. Mange børn gennemgår et stort antal kostbare undersøgelser, uden at der opnås en diagnose, og skønt der ikke findes helbredelse, har kendskab til årsagen betydning for prognose, behandling og rådgivning af familien med henblik på gentagelsesrisiko. Ifølge vores resultater vil omkring 12% af disse børn få en diagnose ved HR-CGH-undersøgelse, og med metoden vil man utvivlsomt kunne bidrage til at definere nye mikrodeletionssyndromer. Oplosningen ved HR-CGH er ca. tre megabasepar, og man kan således ikke påvise alle mikrodeletioner med metoden. Ikke desto mindre anbefaler vi, at alle dysmorfe og mentalt retarderede børn med en normal karyotype bliver undersøgt med HR-CGH.

Korrespondance: *Maria Kirchoff*, Klinisk Genetisk Afdeling 4052, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: markir@rh.dk

Antaget: 4. februar 2004

Taksigelser: Tak til Ivan Nielsens Fond for Personer med Specielle Sindslidelser, Rigshospitalets Forskningsudvalg, Brødrene Hartmanns Fond samt Kromosomforskningsfonden ved Rigshospitalet for økonomisk støtte.

This article is based on a study first reported in the American Journal of Medical Genetics 2004;127A:111-7.

*) Analyse udføres nu udelukkende på CytoVision, ved anvendelse af egen prototype-version af software hvor automatisk tilpasning af akser og subtraktion af baggrund er blevet optimeret til HR-CGH.

Litteratur

- Xu J, Chen X. Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet* 2003;117C:15-24.
- Knight SJ, Regan R, Nicod A et al. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 1999;354:1676-81.
- Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am J Hum Genet* 2000;67:1356-9.
- Rosenberg MJ, Killoran C, Dziadzio L et al. Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum Genet* 2001;109:311-8.
- Riegel M, Baumer A, Jamar M et al. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 2001;109:286-94.
- Fan YS, Zhang Y, Speevak M et al. Detection of submicroscopic aberrations

VIDENSKAB OG PRAKSIS | KASUISTIK

- in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 2001;3:416-21.
7. Rossi E, Piccini F, Zollino M et al. Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet* 2001;38:417-20.
 8. Anderlid BM, Schoumans J, Annerén G et al. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 2002;107:275-84.
 9. Baker E, Hinton L, Callen DF et al. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 2002;107:285-93.
 10. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS et al. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 2003;5:28-34.
 11. Kirchoff M, Rose H, Maahr J et al. High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dysmorphic patients with normal or apparently balanced karyotypes. *Eur J Hum Genet* 2000;8:661-8.
 12. Kirchoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *J Med Genet* 2001;38:740-4.
 13. Kirchoff M, Gerdes T, Rose H et al. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998;31:163-73.
 14. Kirchoff M, Gerdes T, Maahr J et al. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chrom Cancer* 1999;25:410-3.
 15. Kirchoff M, Rose H, Lundsteen C. Påvisning af submikroskopiske kromosomfejl med komparativ genomisk hybridisering. *Ugeskr Læger* 2001;163:5652-7.
 16. Ness GO, Lybæk H, Houge G. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2002;113:125-36.

Streptococcus pyogenes som årsag til primær peritonitis

Reservelæge Nina la Cour Freiesleben &
overlæge Jens Jørgen Kjer

Amtssygehuset i Glostrup, Gynækologisk-Obstetrisk Afdeling

Primær peritonitis (PP) defineres som en infektion i peritonealcaviteten uden identificeret intraabdominal kilde.

PP forårsaget af gruppe A-streptokokker (GAS) er en sjælden tilstand, der hos voksne oftest ses i forbindelse med et underliggende medicinsk problem som f.eks. levercirrose med ascites, nefrotisk syndrom eller i forbindelse med immunosuppressiv behandling. Pneumokokker, colibakterier og stafylokokker er hyppige fund ved PP [1].

Vi beskriver et tilfælde af GAS PP hos en yngre rask kvinde.

Sygehistorie

En 33-årig, tidligere rask kvinde blev indlagt med fire dage varende smerter i nedre abdomen. På indlæggelsesdagen var der tynd afføring. Patienten havde regelmæssige menstruationer, og der var intet usædvanligt udflåd.

Objektivt var patienten smertepåvirket, blodtrykket var på 104/65, pulsen var 116 og temperaturen 39,4°C.

Der var direkte og indirekte ømhed af nedre abdomen, og tarmlydene var naturlige, men sparsomme. Ved rektal eksploration var der ømhed mod højre samt fortild ved portio. En gynækologisk undersøgelse (GU) afslørede let ømhed af portio. Der var ingen dislokationsømhed af uterus eller ømhed over adnekserne.

Urinstiks viste 1+ for leukocytter, og urin-choriongonado-

tropin var negativ. Der var let leukocytose (10,7 mia. pr. l) og C-reaktivt protein på 358 mg pr. l. Blod og urin blev sendt til dyrkning, og der blev givet gentamicin og metronidazol intravenøst.

På mistanke om appendicitis acuta blev der foretaget laparoskopisk lapa-roskopi med appendektomi. Man fandt blodtilblandet, blakket væske i højre fossa. Appendix var fortykket og inflammeret, men perforation kunne ikke påvises. Genitalia interna, galdeblæren, leveren og 1 m tyndtarm oralt for ileocøkalstedet var normale.

Næste dag forværredes patientens tilstand i form af dårligere almen tilstand, højfebrilia, kulderystelser samt peritoneal reaktion.

På mistanke om tarmperforation blev der foretaget laparoskopisk lapa-roskopi, hvor man fandt purulent peritonealvæske og spredte fibrinbelægninger. Tubae uterina, overvejende den venstre, fandtes ødematøse og injicerede, ovarierne normale og tarmen præget af paralyse. Øvrige abdomen var upåfaldende. På mistanke om salpingitis blev patienten flyttet til gynækologisk afdeling, og den antibiotiske behandling blev suppleret med cefuroxim.

På grund af vedvarende mavesmerter de næste syv dage samt svingende temperatur, blev der foretaget ultralydunder-søgelse og CT af abdomen på mistanke om absces. Der blev påvist lidt fri væske intraabdominalt, men i øvrigt intet patologisk. Pga. tynde afføringer blev fæces undersøgt for tarm-patogene bakterier, og venlyer gentaget.

Ved en ny GU var der normalt sekret. Ved ultralydunder-søgelse blev der ved punktur udhentet væske fra en 4 × 4 cm ekkofattig udfyldning i højre fossa samt fri væske fra fossa vesicouterina.