

Abstract

Objectives:

1. To find a frequency of Fragile X Syndrome (FXS) in Thai children with developmental delay of unknown cause.
2. To find patterns and relationship of CGG repeat numbers, and haplotypes in selected normal Thai and FXS subjects.

Methodology:

1. We screened 293 boys and 69 girls with developmental delay of unknown cause (age ≤ 15 years). Four hundred and five non-FXS subjects were randomly selected as control normal DNA.
2. A six-item clinical checklist was used including family history (FH), long and narrow face (F), prominent and large ears (E), attention deficit/hyperactivity (AH), autistic-like behaviors (AT) and testicular volume (T). These were scored as 0 if absent, 1 if borderline, and 2 if present.
3. We used PCR and/or EcoRI/EagI double digestion and hybridized with StB12.3 probe, to screen the patients. The PCR was also used for typing microsatellites and single-nucleotide polymorphisms. The specific probes or restriction enzyme were applied depend upon types of microsatellites and single-nucleotide polymorphisms.
4. We used a logistic regression model from a computer program to analyze the clinical checklist data (Stata, version 5.0). Chi-square and t-tests were used to test significant difference between comparative groups at $P = 0.05$ as a threshold.

Results:

1. We screened for FXS in 293 Thai boys with developmental delay (DD) of unknown cause. We found 21 (7.2%) to have FXS. We ascertained these 21 families and 2 previously known FXS families. We found 39 affected males, 7 affected females, 4 male carriers and 30 female carriers. Carriers had 60–125 CGG repeats while, affected individuals had > 200 CGG repeats.
2. We studied 179 unrelated non-FXS cases and 27 FXS cases from 18 families. We proposed a five-item clinical checklist for screening for FXS in DD Thai boys. We found that a five-item checklist, $2FH + F + 0.5E + 2AH + T = \text{total score}$, was the best model. When we used this clinical checklist with a threshold of total score of 4, 78.7% (specificity) of the screened cases with total scores ≤ 4 could be eliminated as negative cases. In addition, all positive FXS cases had total scores > 4 (sensitivity = 100%).

3. To determine if FXS may have a specific haplotype association we analyzed 125 unrelated control subjects and 25 unrelated FXS patients. We used three markers and two single nucleotide polymorphisms. We found 54 and 14 haplotypes in control and FXS subjects, respectively. No significant of a specific haplotype association in either the controls or FXS group.

Discussion and Conclusions

We found approximately 7% of FXS in DD Thai boys. This is somewhat high compared to previous reports on other populations. This may due to our use of more strict screening criteria. We propose a cost-effective five-item clinical checklist for FXS screening in male pediatric population with developmental delay of unknown cause, particularly from Asian population settings. In addition, we found no specific haplotype association in either normal control nor FXS groups suggesting no founder effect. This result contrast with most other reports on FXS founder effects in different ethnic groups. Our studies might support the thought that FXS is common enough to screen in Thai DD patients. In addition, our experience will lead to the prevention of this disease using molecular testing for prenatal diagnosis.

Suggestions/further Implication/Implementation

1. Screened cases with normal *FMR1* gene need to be further investigated to find a possible cause of developmental delay, particularly a case with high checklist score or a case with DD family history. The FRAXE may be one of the etiology. Otherwise, screening the whole *FMR1* gene may need to be done to test whether this candidate case has another mutation.
2. The analysis of AGG interruption is an interesting project. This is to predict a risk of having an affected child and CGG repeat instability mechanism.
3. Protein expression is a good predictor for genotype-phenotype correlation, particularly in prenatal cases. However, we need to find a simple and liable protein expression method.
4. Our studies provide a cost effective clinical checklist for FXS screening. In addition, we show modified DNA testing techniques in FXS. These methods can apply for clinical service in prenatal and postnatal cases.

Keywords clinical checklist, fragile X, *FMR1* gene, haplotype, founder effect

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาความถี่และแบบประเภณลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยปัญญาอ่อนและพัฒนาการช้าโดยไม่ทราบสาเหตุในเด็กไทย
2. เพื่อหาลักษณะและความสัมพันธ์ของจำนวนซ้ำของ CGG และ Haplotype ในผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะและคนไทยที่มีจำนวน CGG ปกติ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ผู้ป่วยเด็กชายไทย 293 คน ผู้ป่วยเด็กหญิง 69 คน ผู้ป่วยทุกคนอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15 ปี จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โรงพยาบาลรามารับดี และ โรงพยาบาลราชานุกูล ผู้วิจัยเลือกแบบสุ่มในคนที่ไม่ใช่กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะจำนวน 405 คน เพื่อใช้เป็นกลุ่มคนที่ปกติ
2. ใช้แบบประเภณลักษณะทางคลินิก 6 ข้อ คือ ประวัติครอบครัว (FH), ใบหน้ายาวแคบ (F), หูกางและ/หรือใหญ่ (E), สมาริสน์และ/หรือขนอยู่ไม่นิ่ง (AH), พฤติกรรมแบบออทิสติก (AT) และขนาดของอวัยวะ (T) การให้คะแนนมี 3 ระดับคือ 0 คะแนนเมื่อไม่พบ, 1 คะแนนเมื่อไม่ชัดเจนหรือพบลักษณะแบบใดแบบหนึ่งในข้อประเภณนั้น และ 2 คะแนนเมื่อชัดเจน
3. ตรวจดีเอ็นเอของยีนในกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะ (*FMR1*) โดยการทำให้สั้นและ/หรือการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*/*EagI* แล้วตรวจจับด้วยโพรบ *StB12.3* ส่วนไมโครแซทเทลไลต์และความแปรผันของนิวคลีโอไทด์เดียวใช้การทำพีซีอาร์ แล้วนำไปตรวจจับด้วยโพรบจำเพาะหรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
4. วิเคราะห์ผลการศึกษาจากข้อมูลผู้ป่วยใช้ Logistic regression จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Stata version 5.0 และทดสอบค่าความแตกต่างด้วยไครส์เคิร์ฟ หรือ t-test

ผลการศึกษา

1. การศึกษาในกลุ่มเด็กชายไทยที่มีพัฒนาการช้าโดยไม่ทราบสาเหตุจำนวน 293 รายโดยการตรวจดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ Southern blot พบ FXS 21 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.2 เมื่อศึกษาต่อไปในครอบครัวทั้ง 21 รายนี้และอีก 2 ครอบครัวที่เคยตรวจพบแล้วว่าเป็น FXS พบผู้ป่วยชาย 39 ราย ผู้ป่วยหญิง 7 ราย ผู้ชายที่เป็นพาหะ 4 ราย และผู้หญิงที่เป็นพาหะ 30 ราย ผู้ที่เป็นพาหะมีจำนวนซ้ำของ CGG 60-125 ซ้ำ แต่ผู้ป่วยมีจำนวนซ้ำของ CGG มากกว่า 200 ซ้ำ
2. ผู้วิจัยศึกษาเด็กชายที่มีพัฒนาการช้าโดยไม่ทราบสาเหตุที่ไม่ใช่กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะจำนวน 179 คนและผู้ป่วยกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะจำนวน 27 คนจาก 18 ครอบครัว ผลการวิเคราะห์ได้แบบประเภณที่สำคัญ 5 ข้อคือ $2FH + F + 0.5E + 2AH + T = \text{total score}$ เป็นโมเดลที่ดีที่สุด ค่าของคะแนนรวมที่เท่ากับ 4 เป็นจุดวิกฤตของการตัดสินใจว่าจะส่งตรวจดีเอ็นเอในกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะหรือไม่ ในกลุ่มที่ไม่ใช่กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะมีคะแนนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 คือมีความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 78.7 แต่กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะทุกรายมีคะแนนรวมมากกว่า 4 คือมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 100

3. ศึกษาในกลุ่มคนปกติ 125 ราย และผู้ป่วย FXS 25 ราย ที่ไม่เป็นญาติกันจากประวัติครอบครัว การศึกษาใช้ marker 5 ตัวที่ใกล้กับยีน *CGG-FMR1* พบว่าไม่มีความแตกต่างของ haplotype ในกลุ่มทั้งสอง

วิจารณ์และสรุป

การศึกษากลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะนี้แสดงให้เห็นว่ามีโรคนี้ในเด็กชายไทยที่มีพัฒนาการช้าที่ไม่ทราบสาเหตุค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ อาจจะเป็นเพราะการคัดเลือกที่มีแบบประเมินอย่างชัดเจน ผู้รายงานเสนอว่าควรนำแบบประเมินลักษณะทางคลินิก 5 ข้อที่ศึกษานี้ไปใช้ในการตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะในผู้ป่วยเด็กชายโดยเฉพาะจากคนเอเชีย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่าการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติในคนไทย ไม่มี haplotype ที่จำเพาะ บ่งชี้ว่าไม่น่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกัน ซึ่งต่างกับการศึกษาส่วนใหญ่ในคนเชื้อชาติอื่นๆ การศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า FXS พบได้บ่อยพอที่จะมีการตรวจกรองในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีพัฒนาการช้า และสามารถป้องกันโรคได้โดยการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยการตรวจดีเอ็นเอที่ยีนโดยตรงหรือการตรวจ haplotype

คำแนะนำ/ การศึกษาเพิ่มเติม/การนำไปใช้ประโยชน์

1. ควรมีการศึกษาผู้ป่วยในรายที่ไม่ใช่กลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะต่อไปว่าเกิดจากสาเหตุอะไร โดยเฉพาะรายที่มีคะแนนรวมจากแบบประเมินลักษณะทางคลินิกสูง หรือมีประวัติครอบครัว โดยการตรวจกรองกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะตำแหน่ง E หรือ ตรวจกรองหาความผิดปกติของยีน *FMR1* ทั้งหมดเพื่อหาความผิดปกติแบบอื่น
2. การศึกษาหาลักษณะ AGG interruption ในส่วนลำดับการซ้ำของ CGG เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการให้คำแนะนำปรึกษาทางพันธุกรรมเกี่ยวกับความเสี่ยงของการมีลูกเป็นโรคมามากหรือน้อยและกลไกการเกิดความไม่เสถียรในการซ้ำของ CGG
3. การพัฒนาการตรวจการแสดงผลของโปรตีน (protein expression) ให้ทำได้ง่ายและเชื่อถือได้ เพื่อนำมาใช้ทำนายลักษณะทางคลินิก โดยเฉพาะการตรวจก่อนคลอด
4. การศึกษานี้ได้พัฒนาแบบประเมินทางคลินิกและเทคนิคการตรวจดีเอ็นเอในกลุ่มอาการโครโมโซมเอกซ์เปราะให้เหมาะสมกับคนไทย โดยสามารถนำแบบประเมินไปใช้ตรวจกรองผู้ป่วยก่อนที่จะมีการส่งตรวจดีเอ็นเอเพื่อลดค่าใช้จ่าย และนำเทคนิคการตรวจดีเอ็นเอไปใช้ตรวจวินิจฉัยทั้งก่อนและหลังคลอดเพื่อป้องกันการเกิดโรคซ้ำในครอบครัว

คำสำคัญ: แบบประเมินลักษณะทางคลินิก, โครโมโซมเอกซ์เปราะ, ภาวะปัญญาอ่อน, ยีน *FMR1*
แฮปโปไทป์, บรรพบุรุษร่วม