

Eficacia de un test clínico como preselección de niños con sospecha de síndrome X frágil

I. Fernández Carvajal^a, A. Blanco Quirós^a, J. Fernández Toral^b, J.J. Tellería Orriols^a, M.J. Alonso Ramos^a, A. Sanz Cantalapiedra^a, J.F. Martín Rodríguez^c y R. Palencia Luaces^d

^aInstituto de Biología Molecular y Genética (IBGM). ^bUnidad de Genética. Hospital Central de Oviedo.

^cÁrea de Estadística. Universidad de Valladolid. ^dServicio de Pediatría. Hospital Clínico de Valladolid.

(An Esp Pediatr 2001; 54: 326-330)

Antecedentes

El síndrome X frágil (SXF) es la causa hereditaria más frecuente de retraso mental. Puede diagnosticarse con técnicas de genética molecular, pero su variada expresión dificulta la sospecha clínica.

Objetivo

Se valora la utilidad de un test de seis criterios clínicos como método de preselección a los niños candidatos para estudio genético del síndrome.

Pacientes y métodos

Se estudiaron 70 pacientes varones entre 2 y 10 años, con retraso mental de causa desconocida, aplicándoseles un test con seis criterios clínicos (retraso mental, historia familiar de retraso mental, facies alargada, orejas grandes, conducta autística y déficit de atención) que se valoraron de 0 a 2 puntos. En todos se realizó estudio molecular del gen SXF usando reacción en cadena de la polimerasa y Southern blot.

Resultados

El estudio molecular confirmó la mutación completa (> 200 repeticiones CGG) en 14/70 (20%) niños. La suma de 6 puntos en el test fue el límite más discriminativo y fue alcanzado por los 14 enfermos con mutación (100%), pero sólo por 2 de 56 casos (3,5%) sin mutación. El mejor modelo diagnóstico fue la asociación del retraso mental, deficiencia de atención e hiperactividad, historia familiar de retraso mental y orejas grandes seguido de la facies alargada y la conducta autista.

Conclusión

Un test clínico de 6 parámetros facilita la preselección de niños con sospecha de SXF para ser confirmados luego con técnicas de genética molecular.

Palabras clave:

Síndrome X frágil. Retraso mental. Alteraciones de la conducta. Mutaciones dinámicas. Genética molecular. Cromosoma X.

EFFECTIVENESS OF A CLINICAL CHECKLIST IN THE PRESELECTION OF CHILDREN WITH SUSPICION OF FRAGILE X SYNDROME

Background

Fragile X syndrome (FXS) is the most frequent hereditary cause of mental retardation. It can be diagnosed by molecular genetic techniques, but clinical suspicion is made less likely by its variable expression.

Objective

To assess the effectiveness of a six-item checklist in the preselection of children who are candidates for FXS genetic study.

Material and methods

We studied 70 male patients aged between 2 and 10 years with mental retardation of unknown cause. In all patients a checklist with six clinical criteria (mental retardation, history of familial mental retardation, long face, large ears, autistic-like behaviour, and attention deficit disorder with hyperactivity) measured from 0-2 points was applied and molecular genetic studies using polymerase chain reaction and Southern blot were performed.

Results

In 14 of the 70 children (20%) molecular study confirmed full mutation (> 200 CGG repeats). A score of six points in the test had the greatest discriminatory power

Trabajo realizado parcialmente con una ayuda a la investigación de la Junta de Castilla y León (ref. VA 04/95).

Correspondencia: Prof. A. Blanco Quirós.

Área de Pediatría. Facultad de Medicina.

Ramón y Cajal, 5. 47005 Valladolid.

Correo electrónico: ablanco@ped.uva.es

Recibido en febrero de 2000.

Aceptado para su publicación en marzo de 2000.

and was reached by 14 patients (100 %) with mutation, but only by 2 of 56 patients (3.5 %) without mutation. The most accurate diagnostic model was the association of mental retardation, attention deficit disorder with hyperactivity, large ears and a history of familial mental retardation followed by long face and autistic-like behaviour.

Conclusion

The six-item checklist improved the preselection of children with suspicion of FXS, which was later confirmed by molecular genetic techniques.

Key words:

Fragile X syndrome. Mental retardation. Behaviour problems. Dynamic mutations. Molecular genetics. X chromosome.

INTRODUCCIÓN

El síndrome del cromosoma X frágil es la causa hereditaria más frecuente de retraso mental¹. En la actualidad hay descritos más de cien síndromes diferentes ligados al cromosoma X que cursan con retraso mental² y se estima que entre el 40 y el 50 % se deben al síndrome X frágil³⁻⁵.

Este síndrome afecta a 1/1.250 varones y 1/2.500 mujeres⁵⁻⁶, si bien estudios posteriores estimaron la prevalencia en 1/4.000 varones y a 1/6.000 mujeres⁷. Se hereda como un trastorno mendeliano de tipo dominante ligado al cromosoma X, con penetrancia incompleta diferente según el sexo (el 80 % en varones y el 30 % en mujeres) y expresividad variable⁸. El mecanismo principal que causa este síndrome se describe dentro de una nueva clase de anomalías llamadas mutaciones dinámicas, producidas por la expansión anómala de una serie de trinucleótidos trirrepetidos, que provocan una anticiación genética mediante la cual el grado de afectación del síndrome aumenta (debido a una mayor expresividad) a lo largo de generaciones sucesivas. Así, en el síndrome X frágil se observa un incremento en el número de afectados en las generaciones sucesivas, lo que se conoce como paradoja de Sherman⁵⁻⁹. El mecanismo molecular del síndrome X frágil consiste en una expansión de la secuencia CGG mayor de 200 repeticiones (en condiciones normales, esta repetición de carácter polimórfico, oscila entre 6 y 50), en una región no codificante del primero de los 17 exones del gen FMR1 en el cromosoma X. Esto produce una metilación de la isla CpG adyacente, lo cual a su vez impide la expresión de la proteína FMRP, cuya ausencia se traduce en el fenotipo X frágil¹⁰⁻¹⁶.

Las características fenotípicas del síndrome varían según el sexo y la edad del individuo afectado¹⁶⁻¹⁸. Las más comunes son dismorfia facial, anomalías ortopédicas, anomalías cardíacas, manifestaciones en varios tejidos y disfunciones endocrinas que son más llamativas en el varón¹⁹⁻²⁰. Además, la mayoría de los enfermos presentan hiperactividad y problemas de atención. El lenguaje de

los pacientes afectados es pobre y repetitivo, tienen desorganización del pensamiento con ideas agrupadas que son comunicadas de una forma rápida y difícil de entender. Las mujeres afectadas presentan problemas de atención y tendencia a la distracción, pero habitualmente sin una hiperactividad demasiado llamativa. El grado de afectación intelectual de los varones varía desde la dificultad del aprendizaje con un cociente intelectual en el límite de lo normal, hasta deficiencias graves que se modifican con la edad. Las mujeres suelen mostrar un retraso mental más leve, aunque también pueden sufrir problemas de aprendizaje escolar²¹.

Como primer paso para la detección de los pacientes con sospecha de síndrome X frágil, el médico debe prestar mucha atención a los aspectos clínicos. La gran variabilidad expresiva del síndrome dificulta la presunción diagnóstica.

Desde el descubrimiento del gen FMR1 con 27 exones⁹, localizado en el locus FRAXA (Xq27.3), se están empleando técnicas de genética molecular muy exactas en el diagnóstico de este síndrome^{1,22-25}, pero debido a su coste no pueden aplicarse masivamente en todos los individuos sospechosos, y es necesario realizar una selección previa. En el presente trabajo se valora la utilidad de un test de seis criterios clínicos para seleccionar los individuos candidatos, comparando el resultado con el estudio molecular para practicar estudio molecular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

Se estudiaron 70 pacientes con edades comprendidas entre 2 y 10 años, procedentes de la Unidad de Neuro-pediatría del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y del Hospital Central de Oviedo. Todos presentaban diverso grado de retraso mental de etiología no clasificada, y/o alteraciones en su conducta. Es estudio fue prospectivo para el diagnóstico molecular y retrospectivo para la valoración del test clínico.

Modelo de ficha

Tras el estudio de los antecedentes bibliográficos^{26,27} se seleccionaron 6 parámetros clínicos para confeccionar una ficha de recogida de datos. A cada uno se le estimó una puntuación de 0 a 2 y la suma total posible osciló entre 0 y 12 (tabla 1).

Técnicas de diagnóstico molecular

Como material biológico se utilizó ADN obtenido de células nucleadas de sangre periférica de los pacientes seleccionados, mediante extracción con ADN-azol²⁵.

El primer paso diagnóstico se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no radiactiva, utilizando los cebadores F y C de Fu²³, en un termociclador PCR System 2400 (Perkin Elmer®). Con el

TABLA 1. Test clínico de preselección de síndrome X frágil

Parámetro	0	1	2	Puntuación		
Retraso mental (CI)	> 85	70-85	< 70	0	1	2
Historia familiar de retraso mental	No	MPF	MXMR	0	1	2
Facies alargada	No	Algo	Presente	0	1	2
Orejas grandes	No	Algo	Presentes	0	1	2
Déficit de atención y/o hiperactividad	No	Hiperactividad	Ambos	0	1	2
Trastornos con conducta autista*	No	Una	Más de una	0	1	2
Total**						

*Conducta autista: defensa táctil, lenguaje repetitivo, aleteo de manos y escaso contacto visual.

**Más de 5 puntos: sospecha de síndrome X frágil.

CI: cociente intelectual; MPF: alteraciones psiquiátricas en familiares de sexo femenino de origen materno; MXMR: historia en la familia materna de retraso mental ligado al cromosoma X.

producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y posterior tinción con plata para visualizar las bandas obtenidas. Se consideraron normales los pacientes que presentaron menos de 50 repeticiones del triplete CGG; premutados cuando tenían entre 50 y 200 y con expansión completa (síndrome X frágil) si el número era superior a 200.

Como segundo paso diagnóstico, para confirmar los casos positivos, se utilizó la técnica de Southern-blot, pues muchas veces no es posible amplificar mediante PCR alelos con elevado número de repeticiones. Se empleó la sonda ADN Fragile X CHEMI® de 1 kb marcada con dióxigenina y el kit Sure Blot CHEMI®.

Métodos estadísticos

Para valorar la significación estadística de los datos clínicos recogidos en la ficha, se utilizó la prueba exacta de Fisher. También se aplicó el test de regresión logística que permite estudiar de forma simultánea los distintos predictores. Estos cálculos estadísticos se hicieron con la ayuda del programa Stat-View (Abacus Inc., Berkeley, California, EE.UU.). Como índices de valoración de los resultados se tomaron los conceptos de sensibilidad y especificidad y riesgo relativo (RR) de presentar el síndrome.

RESULTADOS

De los 70 pacientes varones estudiados, 56 (80 %) mostraron menos de 50 repeticiones CGG y se consideraron normales, y 14 (20 %) presentaron la expansión completa con más de 200 repeticiones del mencionado triplete. Sólo 2 de 56 (3,6 %) pacientes sin expansión CGG alcanzaron los 6 puntos en el test clínico, mientras que lo hicieron 14 (100 %) que la presentaban (fig. 1).

Sensibilidad y especificidad de los parámetros clínicos

Los criterios con mayor sensibilidad fueron el retraso mental (100 %) y el déficit de atención (100 %), y los más específicos la presencia de orejas grandes (96,4 %) y la historia familiar de retraso mental (89,3 %) (tabla 2).

Riesgo relativo de los parámetros del test

El dato clínico con más alto riesgo fue la historia familiar de retraso mental (RR, 16,84) seguido de las orejas grandes (RR, 5,67). Estos dos datos también fueron los más significativos en el estudio conjunto por regresión lo-

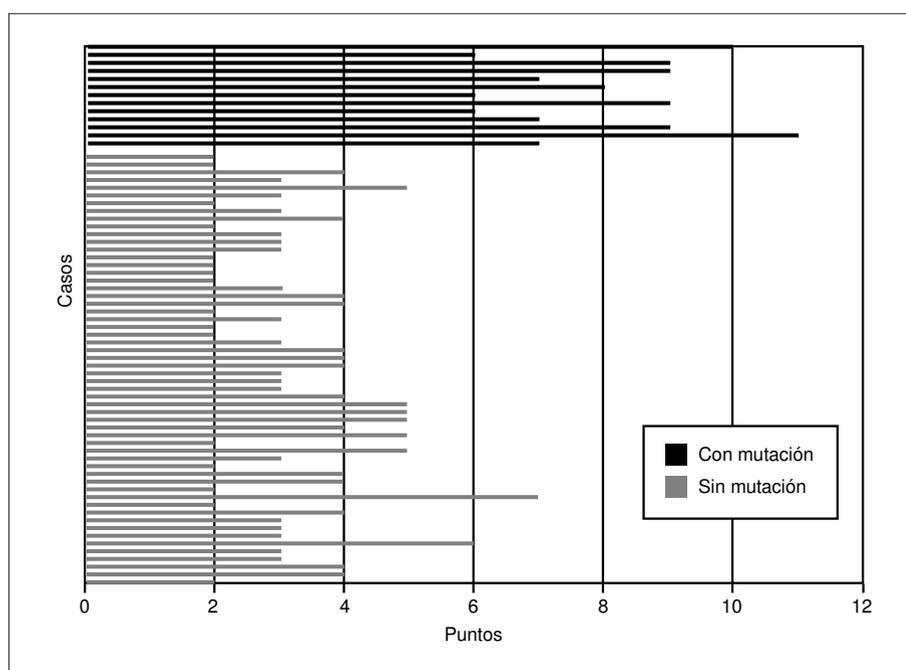


Figura 1. Puntuación de los pacientes sospechosos de síndrome X frágil. Todos los casos comprobados de síndrome X frágil (barras negras) mostraron una puntuación igual o superior a 6. Por el contrario, esta puntuación únicamente la alcanzaron 2 de 56 pacientes en los que se sospechaba, pero no confirmados por técnicas moleculares (barras grises).

TABLA 2. Valor de los parámetros clínicos en el diagnóstico de síndrome X frágil

Parámetro	Retraso mental	Historia familiar	Facies alargada	Orejas grandes	Déficit de atención y/o hiperactividad	Conducta autista
Sensibilidad (%)	100	85,8	71,4	85,7	100	64,3
Especificidad (%)	16	89,3	73,2	96,4	32,1	42,9
Riesgo relativo	NC	16,8*	4,4**	5,7**	NC	1,1

*Sujeto a sesgo de recuerdo. **Sujeto a sesgo de selección.
NC: no calculable.

gística (tabla 3). El retraso mental y la conducta autista se presentaron significativamente asociados en nuestra muestra. El 63,2 % de los pacientes con retraso mental tenían comportamiento autista, frente al 37,5 % en los pacientes sin retraso (RR, 1,7). La facies alargada y las orejas grandes también se asociaban. El estimador odds ratio (OR) para la historia familiar fue 58,49 (intervalo de confianza [IC], 8,0-426,4) con $p = 0,0001$ y el estimador OR para las orejas grandes fue 9,88 (IC, 1,2-81,7) con $p = 0,033$.

DISCUSIÓN

Al plantearnos usar una ficha como posible método de preselección, se descartó el test de Hagerman et al.¹⁶ que incluyen 13 parámetros clínicos, usa demasiados ítems y, por lo tanto, es más laborioso para el pediatra y el médico general que suelen disponer de tiempo limitado de consulta por paciente. Por ello, se aplicó el test de 6 parámetros²⁶ a nuestra población, sumando nuestra experiencia a la previamente obtenida con poblaciones de Estados Unidos²⁶ y de Croacia²⁷. Se valoraron diferentes factores para considerar el mejor modelo, teniendo en cuenta que las estimaciones de los riesgos están sujetas a sesgos de recuerdo, de clasificación y de selección. Así, no pudieron calcularse ni el RR del retraso mental, ni del déficit de atención, ya que todos los pacientes presentaban estos datos clínicos. El mejor predictor parece ser la historia familiar y mejor modelo es el constituido por la consideración simultánea de la historia familiar y la presencia de orejas grandes o prominentes, teniendo en cuenta además que todos presentan retraso mental, seguidos de la facies alargada y la conducta autista.

En nuestro estudio, todos los varones confirmados como portadores de la mutación para el síndrome X frágil (> 200 tripletes CGG) tenían al menos 6 puntos; por el contrario, esa puntuación sólo la alcanzaron 2 de 56 sin mutación (< 50 tripletes CGG). Sobre la base de la sospecha clínica, estos 2 casos son candidatos idóneos para el estudio molecular en busca de mutaciones puntuales intragénicas, que se han descrito como causa del síndrome en el 2-5% de los casos²⁸⁻³⁶.

Se valoraron la especificidad y la sensibilidad de cada uno de los 6 parámetros clínicos recogidos en la ficha, retraso mental-historia familiar-retraso mental-facies alargada-orejas grandes-déficit de atención-conducta autista. El retraso mental y el déficit de atención alcanzaron la máxima sensibilidad (100 %), mientras que los más espe-

TABLA 3. Parámetros clínicos significativos mediante el estudio de regresión logística

Parámetros	Estimador OR	Intervalo de confianza	p
Historia familiar	58,49	8,0-426,4	0,0001
Orejas grandes	9,88	1,2-81,7	0,033

OR: odds ratio.

cíficos fueron la historia familiar de retraso mental (89,3 %) y las orejas grandes (96,4 %). Sin embargo, debe considerarse que no se utilizó una muestra de población general, sino casos "sospechosos" preseleccionados de síndrome X frágil (sesgo de selección), con lo cual las especificidades están infravaloradas.

Al evaluar una historia familiar siempre se produce un sesgo de recuerdo por fallos de la memoria del paciente o su familia, y por la posible omisión del médico al tomar la anamnesis, y que no figuren antecedentes familiares no siempre significa que no los haya. También nos enfrentamos a sesgos de clasificación, la consideración de orejas grandes es, en general, bastante subjetiva, a pesar de la existencia de criterios normalizados.

El riesgo de los distintos factores también fue evaluado y su estimación está sujeta a los anteriores sesgos. En nuestros pacientes el comportamiento autista coincidió con frecuencia con el retraso mental (63,1 %) mientras ocurría más rara vez en los pacientes sin retraso (37,5 %). La cara alargada y las orejas grandes también son signos asociados en nuestros casos, siendo 4,6 veces más probable que alguien tenga la cara alargada si tiene las orejas grandes y 2,5 veces más probable que tenga las orejas grandes si tiene la facies alargada.

Se observaron valores superiores a los hallados en el análisis univariante debido a que en realidad se estaba estimando el riesgo a través de la OR. Además para el presente estudio tan sólo se consideró la presencia o no del signo diagnóstico, para evitar subjetividad y debido a lo reducido de la muestra, sin tener en cuenta el grado. Esta mejora y ajuste de la selección de los pacientes se realizó para mejorar la especificidad sin perder la sensibilidad.

Se valoraron diversos modelos que consideraran de forma simultánea los distintos factores de riesgo. Dejando de lado el retraso mental, pues lo tenían todos los pacientes, el mejor predictor fue la historia familiar, con las du-

das inherentes al sesgo ya comentado. El mejor modelo fue el que consideraba la historia familiar y la presencia de orejas grandes de forma simultánea. En el presente estudio, todos los varones con mutación completa tenían fenotipo característico con retraso mental y déficit de atención y/o hiperactividad.

En conclusión, el empleo del test clínico con 6 parámetros ayuda al pediatra a seleccionar niños con sospecha de síndrome X frágil que se benefician del estudio molecular. Así descendiendo el número de muestras estudiadas por el genetista y, en nuestro caso, hubiera supuesto un ahorro de 52 muestras (74,3%). Esto se traduce en un diagnóstico más precoz y, con ello en un comienzo más temprano de los tratamientos rehabilitadores que, sin duda, mejorará la calidad de vida de estos pacientes y de sus familiares a la espera de que en el futuro pueda disponerse de un tratamiento genético corrector.

BIBLIOGRAFÍA

- Rousseau F, Heitz D, Biancalana V et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991; 325: 1673-1681.
- Lubs H, Arena JF, Chiurazzi L, Tranaabjaerg L, Neri G. XLMR genes update 1995-1996. *Am J Med Genet* 1996; 64: 147-157.
- Ramos F. Avances en el síndrome X frágil y otras enfermedades con anticipación genética. *An Esp Pediatr* 1994; 61: 79-84.
- Ramos F. Deficiencia mental de origen genético. *An Esp Pediatr* 1997; 47: 121-125.
- Sherman SL. The high prevalence of fragile X premutation carrier females: Is this frequency unique to the French Canadian Population? *Am J Hum Genet* 1995; 57: 991-993.
- Webb T, Bunday S. Prevalence of fragile X syndrome. *J Med Genet* 1991; 28: 358.
- De Vries EB, Halley DJ, Costra BA, Niermeijer MF. *J Med Genet* 1998; 35: 579-589.
- Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard Peebles PN, Nielsen KB et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985; 69: 289-299.
- Opitz J. On the gates of the hell and almost unusual gene. *Am J Med Genet* 1986; 23: 1.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl OP, Pizzuti A et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65: 905-914.
- Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, Fenwick RG, Nelson D. Triple repeat mutations in human disease. *Science* 1992; 256: 784-789.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Costra BA, Caskey CT et al. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66: 817-822.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 397-400.
- McConkie-Rosell A, Lachiewicz AM, Spiridigliozzi GA, Tarleton J, Schoenwald S, Phelan MC et al. Evidence that methylation of the FMR-1 locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1993; 53: 800-809.
- Smits A, Smeets D, Hamel B, Dreesen J, D-Haan A, Van Oost B. Prediction of mental status in carriers of the fragile X mutation using CGG repeat length. *Am J Med Genet* 1994; 51: 497-500.
- Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A. Fragile X checklist. *Am J Med Genet* 1991; 38: 283-287.
- Goldson E, Hagerman RJ. The fragile X syndrome. *Devel Med Child Neurol* 1992; 34: 822-832.
- Hagerman RJ. Physical and behavioral phenotype. En: Hagerman RJ, Cronister A, eds. *Fragile X Syndrome: Diagnosis and Treatment*. Baltimore: J Hopkins Univ Press, 1996; 212-310.
- Crabbe LS, Benski A, Hornstein L, Schwartz D. Cardiovascular abnormalities in children with fragile X syndrome. *Pediatrics* 1993; 91: 714-715.
- Hagerman RJ, Synhorst DP. Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1984; 17: 123-131.
- Freund SL, Riess AL. Cognitive profiles associated with the fragile X syndrome in males and females. *Am J Med Genet* 1991; 38: 542-547.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A et al. Instability of a 550bp DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-1102.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991; 67: 1047-1058.
- Pergolizzi RG, Erster SH, Goonewardena P, Brown WT. Detection of full fragile X mutation. *Lancet* 1992; 339: 271-272.
- Ausubel FM, Brent R. Kingston. En: *Current protocols in molecular biology*. Nueva York: John Wiley & Sons, 1990; 2: A.1.5.
- Giangreco CA, Steele MW, Aston CE, Cummins JH, Wenger SL. A simplified six-item checklist for screening for fragile X syndrome in the pediatric population. *J Pediatr* 1996; 129: 611-614.
- Hecimovic S, Barisic I, Pavelic K. DNA analysis of the fragile X syndrome in an at risk pediatric population in Croatia: simple clinical preselection criteria can considerably improve the cost-effectiveness of fragile X screening studies. *Hum Hered* 1998; 48: 256-265.
- Butler MG, Mangrum T, Gupta R, Singh DN. A 15 item checklist for screening mentally retarded males for the fragile X syndrome. *Clinical Genet* 1991; 39: 347-354.
- Arvio M, Peippo M, Simola KO. Applicability of a checklist for clinical screening of the fragile X syndrome. *Clin Genet* 1997; 52: 211-215.
- Mila M, Castellvi-Bel S, Sanchez A, Lazaro C, Villa M, Estivill X. Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR-1 gene. *J Med Genet* 1996; 33: 338-340.
- De Graaff E, Rouillard P, Willens PJ, Smits AP, Rousseau F, Costra BA. Hot spot for deletions in the CGG repeat region of FMR-1 in fragile X patients. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 45-49.
- De Bouille K, Verkerk AJ, Reyners E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet* 1993; 3: 31-35.
- Vincent JB, Koneck DS, Munstermann E, Bolton P, Poustka A, Poustka F et al. Point mutation analysis of the FMR-1 gene in autism. *Mol Psychiatric* 1996; 1: 227-231.
- Wang YC, Lin ML, Lin YC, Li YC, Li SY. Novel point mutation within intron 10 of FMR1 gene causing fragile X syndrome. *Hum Mutat* 1997; 10: 393-399.
- Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A et al. Fragile X syndrome without CGG amplification has an FMR-1 deletion. *Nature Genet* 1992; 1: 341-344.
- Meijer H, De Graaff E, Merckx DM, Jargbloed RJ, de Die-Smulders CE, Engelen JJ et al. A deletion of 1.6kb proximal to the CGG repeat of the FMR-1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 615-620.