

# Zespoły dysmorficzne często spotykane w oddziałach intensywnej terapii noworodków

Nader Bishara, MD\*,  
Carol L. Clericuzio, MD†

Autorzy deklarują brak jakichkolwiek powiązań finansowych związanych z tym artykułem.

**Cele:** Po przeczytaniu tego artykułu czytelnik powinien umieć:

1. Rozpoznać fenotypy wybranych zespołów dysmorficznych, z jakimi można się zetknąć w oddziałach intensywnej terapii noworodka.
2. Opisać właściwe metody postępowania, rokowanie/ryzyko ponownego urodzenia dziecka z określonym zespołem oraz opcje diagnostyki prenatalnej dla tych zespołów.
3. Opisać kliniczne zastosowanie rutynowych i wysokiej rozdzielczości badań chromosomów, fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* i genomowej hybrydyzacji porównawczej z użyciem macierzy.
4. Wyjaśnić, w jaki sposób należy korzystać z trzech internetowych baz danych (PubMed, OMIM, GeneReviews), aby uzyskać pomoc w diagnostyce i leczeniu dzieci z zespołami dysmorficznymi.

## STRESZCZENIE

Neonatologyści odpowiedzialni są za opiekę nad noworodkami cierpiącymi na wiele różnych ciężkich chorób, w tym powikłań będących wynikiem licznych wad wrodzonych. Niniejszy przegląd dostarcza najnowszych informacji na temat rozpoznawania i postępowania w wielu chorobach genetycznych często spotykanych w oddziałach intensywnej terapii noworodka. Przedstawiamy najnowsze narzędzia do diagnostyki dzieci z nieznanymi zespołami chorobowymi (genomowa hybrydyzacja porównawcza z użyciem macierzy) oraz internetowe bazy danych, które mogą być wykorzystywane do diagnostyki dzieci hospitalizowanych w oddziałach intensywnej terapii noworodków.

## Wprowadzenie

W ciągu minionych 3-4 dekad dokonano ogromnego postępu w dziedzinie perinatologii i neonatologii, szczególnie pod względem rozpoznawania i postępowania w chorobach genetycznych. Udoskonalenie technik amniopunkcji, biopsji trofoblastu (ang. Chorion villus sampling, CVS) oraz trójwymiarowa ultrasonografia o wysokiej rozdzielczości to tylko niektóre z tych osiągnięć. Badania chromosomowe o wysokiej rozdzielczości, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (ang. fluorescencje *in situ* hybridization, FISH) oraz porównawcza hybrydyzacja genomowa z wykorzystaniem macierzy (array comparative genomie hybridization, aCGH) to niektóre z narzędzi poszerzające nasze możliwości rozpoznawania zaburzeń genetycznych.

Choroby genetyczne wpływają na zdrowie fizyczne, ale mają też znaczenie psychologiczne i społeczne dla chorego i jego rodziny. Kluczowe znaczenie ma zrozumienie głównych aspektów chorób genetycznych rozpoznawanych w okresie okołoporodowym i narzędzi dostępnych do ustalenia diagnozy. Rodzice chorych dzieci często stają wobec trudnych decyzji związanych z planowaniem rodziny, ponieważ diagnoza może mieć wpływ na przyszłe ciążę. W zależności od rozpoznania, rodzice mogą być zmuszeni do podejmowania decyzji dotyczących badań prenatalnych i przerwania ciąży.

## Letalne lub semiletalne zespoły z wieloma wadami rozwojowymi Trisomia 18 – zespół Edwardsa

Trisomia 18 i inne zespoły z trisomią związane są ze starszym wiekiem matki. Trisomia 18 jest drugim pod względem częstości zespołem uwarunkowanym trisomią autosomów, występującym średnio u 1 na 3000 żywo urodzonych noworodków. Na ogół noworodki z tym zespołem mają niedobór masy ciała i wzrostu w stosunku do wieku ciążowego, a u ich matki w wywiadzie informują o wielowodziu. Badanie surowicy matki pod kątem wielu markerów

\*Division of Neonatology, Department of Pediatrics, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM.

†Division of Clinical Genetics/Dysmorphology, Department of Pediatrics, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM.

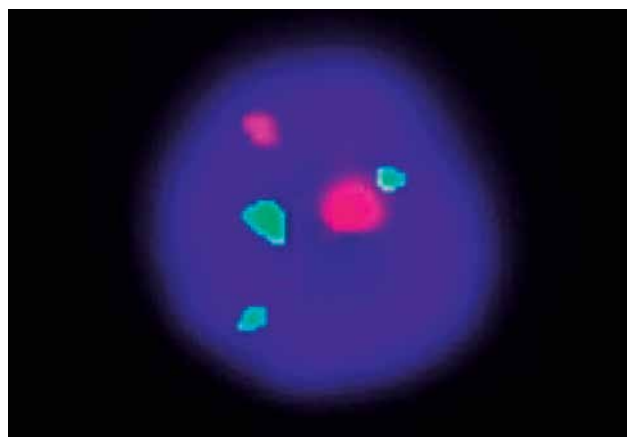


RYCINA 1. Dziecko z niedoborem masy i wzrostu ciała w stosunku do wieku ciążowego, z trisomią 18. Widoczne wąskie szpary powiekowe, nadmierne owłosienie czoła, krótki mostek, podkurczone dłonie, hipoplastyczne narządy płciowe i nieprawidłowo wykształcone stopy. Noworodek ma także wady serca i nerek

(prenatalne badanie przesiewowe) pozwala na wykrycie trisomii 18 w okresie prenatalnym. Charakterystyczne cechy twarzy obejmują małą głowę, wydatną potylicę, małe usta i żuchwę, nisko osadzone i nieprawidłowo uformowane uszy, wąskie szpary powiekowe, umiarkowanie nadmierne owłosienie czoła i pleców (ryc. 1). Dłonie często są podkurczone, z zachodzącymi palcami, mostek na ogół jest krótki. Występujące często wady serca zwykle nie są śmiertelne.

W okresie noworodkowym dziecko słabo ssię, dlatego wymaga zastosowania karmienia przez sondę nosowo-żołądkową. Nawet przy odpowiedniej podaży kalorii, na ogół te dzieci nie wykazują przyrostu masy ciała. Po początkowej hipotonii dochodzi do rozwoju hipertonii. Ponad 50% noworodków umiera w ciągu pierwszego tygodnia po urodzeniu, choć 10% pozostaje przy życiu do roku. Ze względu na ten mały, ale istotny odsetek dzieci pozostających przy życiu po upływie roku, trisomię 18 uznaje się za zespół semiletalny.

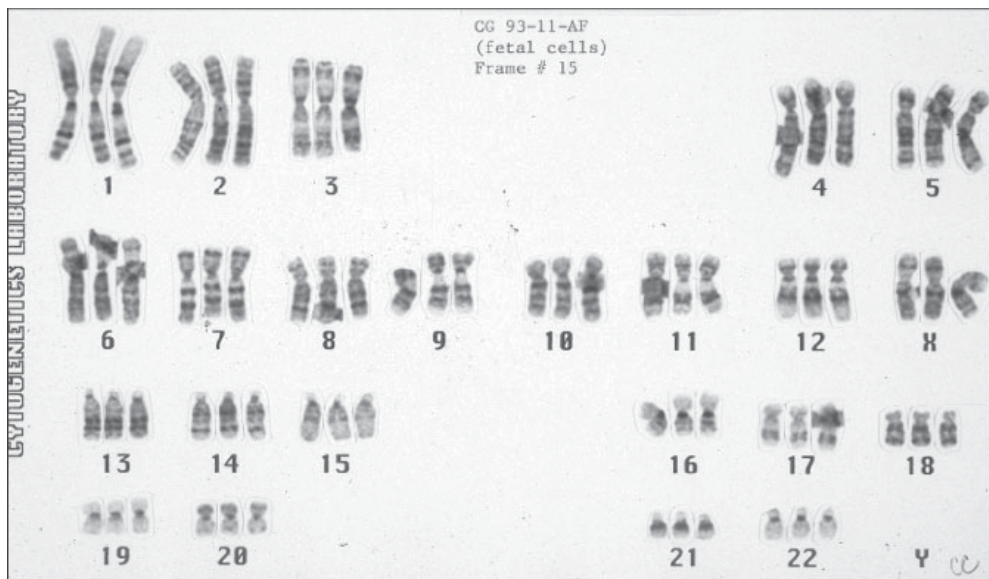
Rozpoznanie można potwierdzić na podstawie 48-godzinnej hodowli limfocytów w laboratorium cytogenetycznym. FISH, której wykonanie zabiera jeden dzień, może dostarczyć wyników szybciej, co ma znaczenie, jeśli dziecko nie jest stabilne, ale ostatecznie konieczne jest określenie kariotypu, aby wykluczyć translokację. Ryzyko ponownej ciąży z trisomią 18 wynosi 1% i przyszłe ciążę można przebadać za pomocą CVS lub amniopunkcji.



RYCINA 2. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* amniocyta w interfazie pochodzącego od noworodka płci żeńskiej z trisomią 13. Widoczne są trzy niebieskie sygnały hybrydyzacyjne odpowiadające centromerom chromosomu 13 i dwa czerwone sygnały hybrydyzacyjne odpowiadające centromerom chromosomów X.

### Trisomia 13 – zespół Patau'a

Trisomia 13 jest trzecią pod względem częstości występowania trisomią autosomów (ryc. 2). Identyfikuje się ją u 1 na 10 000. Żywo urodzone noworodki na ogół mają prawidłową masę urodzeniową, ale występuje u nich mała głowa. Inne wady urodzeniowe obejmują holoprozencefalię (malformacja przodomózgowia i środkowej części



RYCINA 3. Kariotyp triploidii 69,XXX komórki płodu.

twarzy), typowy i nietypowy rozszczep wargi i podniebienia, wady serca (najczęściej ubytek przegrody międzykomorowej), przepuklinę pierścienia pępkowego, polidaktylię pozaosiową, torbielowatość nerek, aplazję skóry i łukowato wygięte stopy z wydatnymi piętami.

Ten zespół wiąże się z głębokim opóźnieniem umysłowym, a mediana przeżycia dla noworodków wynosi 7 dni. Większość dzieci umiera w okresie noworodkowym, choć, podobnie jak w przypadku trisomii 18, 10% dożywa pierwszego roku życia. Rozpoznanie, ryzyko ponownej ciąży z tym zespołem oraz diagnostyka prenatalna są takie same, jak w przypadku trisomii 18.

### Triploidia

Triploidia to występowanie 69 chromosomów (ryc. 3). Płody, które przeżyją, wykazują ciężki niedobór wzrostu, na ogół mają syndaktylię (zrośnięcie palców) i nieprawidłowo wykształcone stopy (ryc. 4). W celu potwierdzenia rozpoznania należy wykonać badanie cytogenetyczne na materiale tkanki łożyska lub płodu. Ryzyko ponownej ciąży z triploidią nie jest podwyższone.

### Wrodzona łamliwość kości typu II

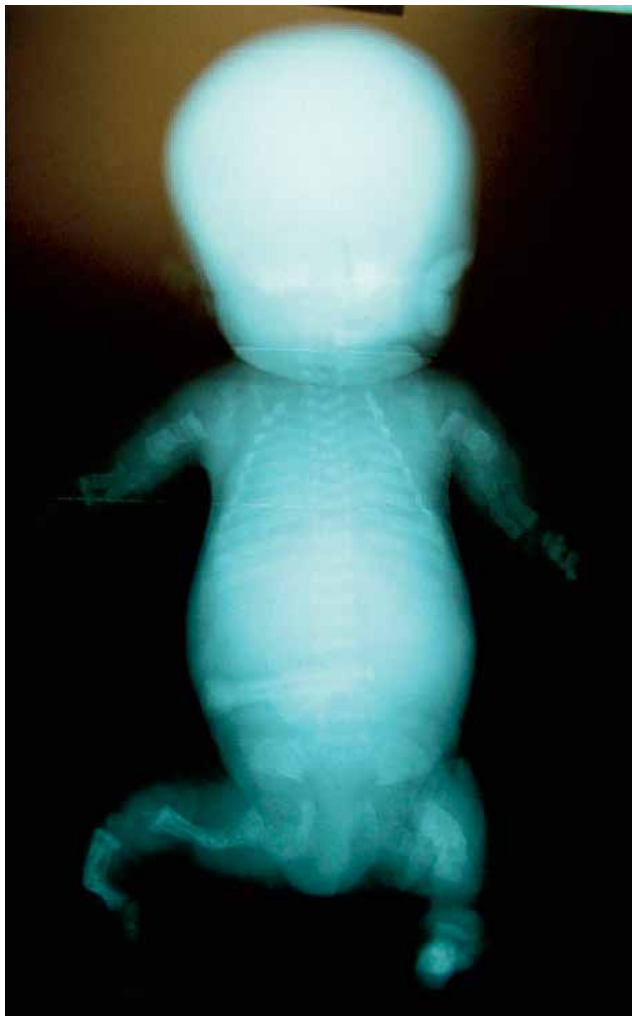
Wrodzona łamliwość kości (osteogenesis imperfecta) typu II jest letalną dysplazją szkieletu i jest najcięższym z podtypów osteogenesis imperfecta. Ten zespół jest wynikiem defektu w genach kodujących prokolagen typu I (*COL1A1* i *COL1A2*). Większość przypadków jest spowodowana sporadyczną mutacją, a ryzyko ponownej ciąży obciążonej tym zespołem sięga 6% ze względu na mozaikowość gonad jednego z rodziców. Zespół charakteryzuje się krótkimi kończynami, wstęgowatymi kośćmi długimi (ryc. 5) oraz licznymi złamaniami, najczęściej obserwowanymi jeszcze w macicy, z tworzeniem



RYCINA 4. Dwudziestotrzytygodniowy płód z triploidią z ciężkim zahamowaniem wzrostu i syndaktylią

wzrostu kostnego. Na żebrach widoczne są zgrubienia, a kości długie są znacznie zdeformowane. Cechy twarzoczaszki obejmują duże ciemiączko, upośledzone kostnienie sklepienia czaszki, płytkie oczodoły, niebiesko zabarwione twardówki oraz niski grzbiet nosa. Większość noworodków rodzi się martwych lub umiera wkrótce po urodzeniu, przede wszystkim z powodu za-





RYCINA 5. Wrodzona łamliwość kości typu II. Należy zwrócić uwagę na „wstęgowate” połamane kości długie i niedostateczne kostnienie czaszki.

burzeń w oddychaniu związanych z niedorozwojem płuc i łamliwymi żebrami lub nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) czy krwotoków. Diagnostyka prenatalna obejmuje ultrasonografię lub analizę DNA w kierunku znanych mutacji w genach dla prokolagenu.

### Zespół Meckela-Grubera

Zespół Meckela-Grubera jest rzadką chorobą dziedziczną autosomalnie recesywnie, charakteryzującą się dużymi torbielowatymi nerkami, polidaktylią pozaosiową i przepukliną mózgową potyliczną (ryc. 6). Pacjenci rzadko przeżywają poza okres noworodkowy ze względu na ciężkie wady OUN i nerek oraz niedorozwój płuc (będący wynikiem kompresji płuc płodu przez powiększone nerki). Ryzyko ponownej ciąży obciążonej tym zespołem wynosi 25%, a rozpoznanie można ustalić na podstawie ultrasonograficznego badania płodu lub analizy DNA w kierunku znanych mutacji.



RYCINA 6. Dziecko z zespołem Meckela i Grubera z przepukliną mózgu w okolicy potylicznej i powiększoną przez wielotorbielowość nerek jamą brzuszną.

### Nietalne zespoły z wieloma wadami rozwojowymi Trisomia 21

Zespół Downa jest najczęstszym zespołem wad wrodzonych spotykanym u ludzi, występującym z częstością 1 na 800 urodzeń. Podobnie jak inne trisomie, wiąże się ze starszym wiekiem matki. Zespół Downa charakteryzuje się uogólnioną hipotonią, krótkogłowieciem z łagodnym małowłowieciem, skośnymi szparami powiekowymi (końce szpar ustawione ku górze), zmarszczkami nakątymi oraz małymi uszami. Ręce są względnie krótkie, z niedorozwojem paliczka środkowego piątego palca i klinodaktylią (skrzywienie, zagięcie palca V) oraz pojedynczymi poprzecznymi bruzdami dłoni. Występuje duży odstęp między pierwszym i drugim palcem stopy. U 40% chorych występują wady serca obejmujące defekty poduszczonek wsierdza (kanał przedsionkowo-komorowy – przyp. red.), ubytek przegrody międzykomorowej, przetrwały przewód tętniczy oraz ubytek międzyprzedsiomkowy.

W każdym przypadku podejrzenia trisomii należy zlecić wykonanie rutynowej analizy chromosomowej. U 95% pacjentów trisomia 21 jest wynikiem nondysjunkcji, czyli nierozłączenia się chromosomów podczas mejozy. Ryzyko ponownej ciąży obciążonej trisomią 21 wynosi 1% i wzrasta powyżej 40 roku życia matki. Rodzice nie muszą mieć wykonywane badanie cytogenetyczne, chyba, że występuje chromosom translokacyjny. W takim przypadku ryzyko ponownej ciąży obciążonej tym zespołem zależy od tego, czy jedno z rodziców jest nosicielem takiego chromosomu. Około 1% dzieci z zespołem Downa ma mozaikową trisomię 21, tzn. część komórek ma prawidłowy, a część zmieniony (zawierający dodatkowy chromosom 21) zestaw chromosomów. Ryzyko ponownej ciąży z tym defektem jest takie samo jak w przypadku typowej (prostej) trisomii 21, która jest wynikiem nieprawidłowego podziału meiotycznego przed zapłodnieniem. Rozpoznanie prenatalne oparte jest na CVS lub punkcji owodni. Choć wszystkim ciężarnym oferuje się badania przesiewowe w drugim i trzecim trymestrze, nie zastępują one badań diagnostycznych w przypadku par obciążonych ryzykiem.

### Zespół Turnera

Zespół Turnera należy podejrzewać u noworodków płci żeńskiej z objawami obrzęku płodu (ryc. 7), takimi jak obszerne fałdy skóry w okolicy karku (ryc. 8), czy obrzęk grzbietu stóp z małymi paznokciami. Badania kariotypu należy też wykonać u noworodków płci żeńskiej, u których stwierdza się krytyczne zwężenie aorty związane z dwupłatkową zastawką aorty lub koarktacją aorty (zwężenie cieśni aorty). Dzieci z tym zespołem w chwili urodzenia na ogół są małe. Zespół Turnera jest wynikiem częściowego lub całkowitego braku jednego z chromosomów X. Połowę stanowią mozaiki, np. 45,X/46,XX. Rozpoznanie opiera się na rutynowych badaniach chromosomów. W przypadku rozpoznania tego zespołu należy dodatkowo, za pomocą FISH, ocenić 200 komórek pod kątem chromosomów X i Y w celu wykluczenia obecności chromosomu Y. Postępowanie obejmuje ocenę kardiologiczną w celu stwierdzenia dwupłatkowej zastawki aorty, koarktacji aorty, zastawkowego zwężenia aorty i wypadania płotka zastawki mitralnej. Zaleca się wykonanie ultrasonografii nerek, ponieważ 40% chorych dzieci ma zaburzenia nerek, takie jak nerka podkowiasta. Ryzyko wystąpienia tego zespołu w przyszłej ciąży nie jest podwyższone. Występowanie zespołu podejrzewa się w przypadku wykrycia płodowego wodniaka torbielowatego szyi lub obrzęku/puchliny płodu.

### Zespół 5p- (Cri du chat)

Występowanie zespołu 5p- należy podejrzewać u noworodków małych względem wieku ciążowego, z małą głową, okrągłą twarzą oraz hiperteloryzmem, szparami powiekowymi skierowanymi ku dołowi oraz pojedynczą poprzeczną bruzdą wewnątrz dłoni. Płacz noworodków z tym zespołem często przypomina miauczenie kota, co jest związane z hipotonią i wadami krtani. Większość pacjentów wykazuje umiarkowany do ciężkiego niedorozwój umysłowy. W miejsce rutynowej oceny cytogenetycznej, zalecanej w przypadku podejrzenia trisomii, należy przeprowadzić analizę chromosomową metodą zapewniającą wysoką rozdzielczość. Badanie metodą wysokiej rozdzielczości jest konieczne, jeśli celem jest identyfikacja małych genomowych duplikacji lub delecji. Rutynowe badanie jest tańsze i wystarczająco dokładne do określenia liczby chromosomów. Jeśli w badaniu o wysokiej rozdzielczości chromosomy wydają się prawidłowe, ale nadal, opierając się na cechach klinicznych, podejrzewa się występowanie tego zespołu, należy zlecić wykonanie FISH pod kątem 5p-. Delecje *de novo* odpowiadają za 85% przypadków, 15% przypadków jest spowodowanych translokacją u jednego z rodziców. Zatem, we wszystkich przypadkach rodzicom należy zaproponować wykonanie analizy chromosomowej. Dla cięż obarczonych ryzykiem dostępne są badania prenatalne w postaci CVS lub amniopunkcji.

### Zespoły mikrodeleccyjne

Zespoły mikrodeleccyjne są to zaburzenia wywołane delecjami chromosomowymi obejmującymi szereg genów, czę-



RYCINA 7. Obrzęk stóp w zespole Turnera.



RYCINA 8. Nadmierne fałdy skóry na karku w zespole Turnera.

sto jednak zbyt małymi, aby można je było wykryć za pomocą konwencjonalnych metod cytogenetycznych, a nawet o wysokiej rozdzielczości. Do rozpoznawania tych zespołów wykorzystuje się molekularne techniki cytogenetyczne, w tym FISH i aCGH.

**Zespół podniebieno-sercowo-twarzowy DiGeorge'a (delecja 22q11.2).** W przeszłości tę chorobę opisywano jako dwa odrębne zespoły. W 1965 roku DiGeorge opisał niedorozwój grasicy i przytarczyc, prowadzący do hipokalcemii noworodków, wady serca dotyczące podziału stożka i pnia naczyniowego (np. przerwanie łuku aorty, wspólny pień tętniczy i tetralogia Fallota), szeroką twarz, niewielkie nieprawidłowości w budowie uszu oraz problemy w karmie-

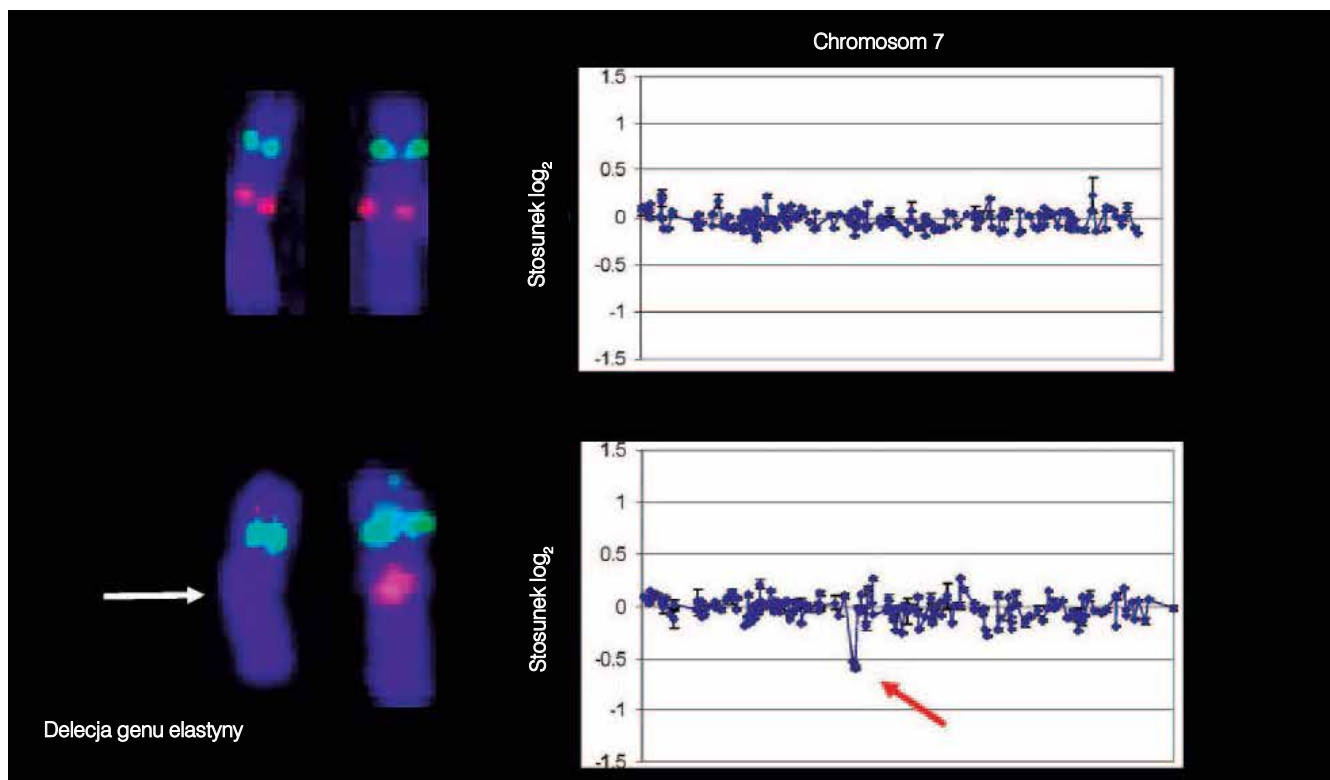
niu. W 1981 r. wykryto, że przyczyną tych zaburzeń jest delecja w chromosomie 22, w pozycji q11.2. W 1978 r. Sphrintzen opisał zespół obejmujący rozszczep podniebienia, sekwencję Pierre’a Robina z długą wąską twarzą, wydłużonym nosem z zaokrąglonym czubkiem, ubytkiem przegrody międzykomorowej serca oraz zaburzeniami wzrostu i trudnościami w uczeniu się. Ten zespół dziedziczony jest autosomalnie dominująco i w 1992 r. wykryto, że także związany jest z delecją w pozycji 22q11.2. Zatem oba zespoły prezentują różnorodność fenotypową związaną z tą bardzo powszechną delecją chromosomową.

Obecnie zalecane postępowanie polega na ocenie wszystkich pacjentów z wrodzoną wadą serca w celu wykrycia tej delecji. Jeśli podejrzewa się jej występowanie, należy zlecić wykonanie analiz chromosomowych o wysokiej rozdzielczości oraz FISH w kierunku 22q11.2. Laboratorium wykonujące badanie powinno wiedzieć, jakie są wskazania do jego wykonania, np. wrodzona wada serca i rozszczep podniebienia. Rodzicom chorych dzieci należy zaproponować wykonanie FISH w poszukiwaniu tej delecji, ponieważ 7% jest jej nosicielami, a ryzyko ponownej ciąży z tym zespołem zależy od tego, czy delecja powstała *de novo* (ty-

zyko bardzo niskie), czy też występuje u jednego z rodziców (50% ryzyko ponownej ciąży z tym zespołem). Diagnostyka prenatalna opiera się na CVS lub amniocentezie. Test FISH należy zlecić jako badanie dodatkowe.

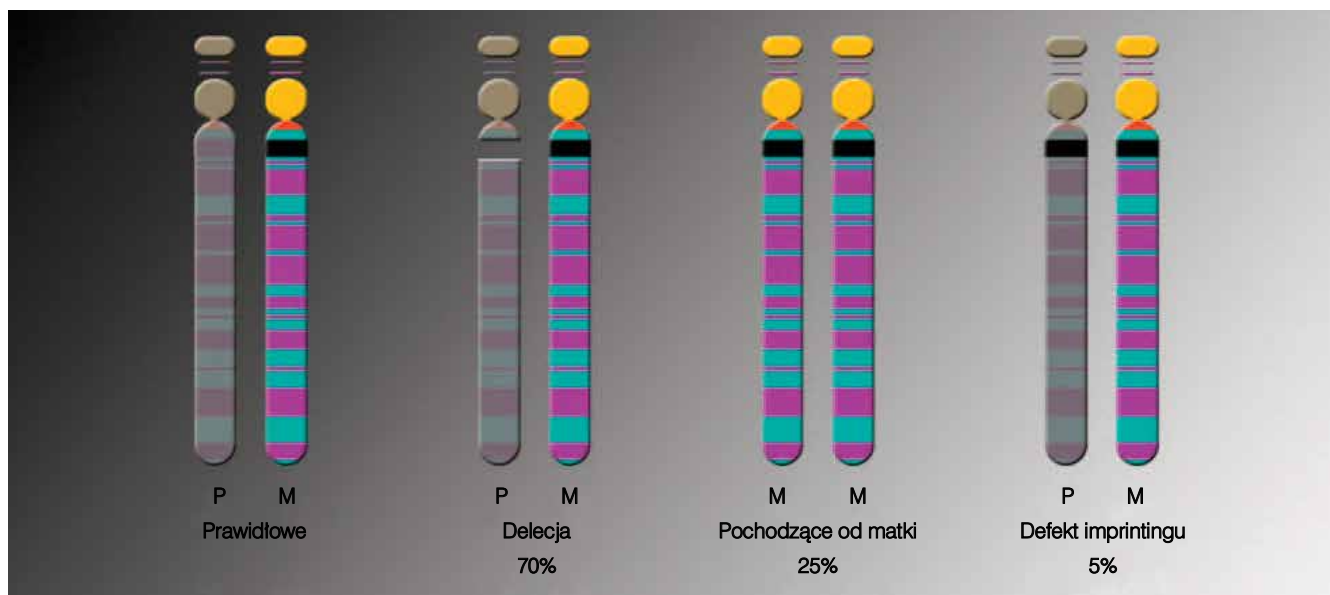
**Zespół Williamsa (delecja 7q11.23).** Zespół Williamsa charakteryzuje się zahamowaniem wzrostu. Typowe cechy twarzy obejmują szerokie czoło, sprawiające wrażenie opuchniętych okolice okołoooczodołowe oraz szerokie usta. Występuje także nadzastawkowe zwężenie aorty, a u 15% chorych idiopatyczna hiperkalcemia. U pacjentów, u których rozpoznano zespół Williamsa, należy wykonać ultrasonograficzne badanie nerek oraz ocenić, czy występują trudności w karmieniu. Zespół Williamsa jest wynikiem delecji genu elastyny (*ELN*) i innych genów położonych w pozycji 7q11.23. W przypadkach, gdy podejrzewa się występowanie tego zespołu, należy zlecić wykonanie badania cytogenetycznego o wysokiej rozdzielczości oraz FISH ze specyficzną sondą 7q11.23. Praktycznie wszystkie delecje powstają *de novo* i badania rodziców nie są zalecane.

Mikrodelecja w zespole Williamsa może też zostać wykryta za pomocą aCGH i FISH (ryc. 9). Badanie aCGH pozwala na wykrycie mniejszych zaburzeń genomowych



RYCINA 9. Dwa chromosomy 7 przedstawione w lewym górnym rogu ryciny nie mają delecji, na co wskazuje obecność dwóch różowych sygnałów emitowanych przez sondę *ELN* hybrydującą z genem *ELN*. Sondy zielone stanowią kontrolę. Chromosom 7 w lewym dolnym rogu ryciny (pochodzący od innego pacjenta) nie ma różowego sygnału hybrydyzacji, co wskazuje na delecję genu *ELN*, odpowiadającą zespołowi Williamsa. Dwa panele po prawej stronie prezentują wyniki porównawczej hybrydyzacji genomowej obu pacjentów. Na panelu w prawym górnym rogu materiał genomowy zawarty w chromosomie 7 nie wykazuje istotnych odchyłeń od linii podstawowej, tzn. nie wykazuje utraty lub nadmiaru materiału genomowego. W prawym dolnym rogu czerwona strzałka wskazuje na brak materiału genomowego w locus odpowiadającym *ELN*, co odpowiada zespołowi Williamsa. Rycinę otrzymano dzięki uprzejmości Kate Rauen, MD, PhD





RYCINA 10. Mechanizmy genetyczne prowadzące do wystąpienia zespołu Pradera i Williego (PWS). Należy zwrócić uwagę, że fragment 15q11-13, krytyczny w PWS, w warunkach prawidłowych jest piętnowany (wyłączony, czyli nieaktywny) w chromosomie pochodzącym od matki, co zaznaczono czarnym prostokątem.

niż analiza chromosomowa o wysokiej rozdzielczości i umożliwia przesiewową ocenę całego genomu. Na rycinie 9 przedstawiono wyniki analizy macierzy tylko dla chromosomu 7, ale dostępne na rynku macierze obejmują cały genom.

### Zaburzenia rodzicielskiego piętnowania genomowego

W prawidłowej sytuacji każdy gen występuje w dwóch kopiach (allelach) odziedziczonych podczas zapłodnienia po jednej od każdego z rodziców, które funkcjonują równie dobrze, bez względu na to czy zostały przekazane z materiałem genetycznym matki, czy ojca. Mniej niż 1% genów jest jednak imprintowanych (napiętnowanych, naznaczonych), co oznacza, że istnieje różnica w ich ekspresji w zależności od tego, od którego z rodziców pochodzi dana kopia genu. Dwa najczęściej występujące u noworodków zaburzenia związane z rodzicielskim piętnowaniem genomowym to zespoły Pradera i Williego oraz Beckwitha i Wiedemanna.

**Zespół Pradera-Williego (PWS).** Charakteryzuje się on ciężką hipotonią, wnetrostwem i ciężkimi zaburzeniami w karmieniu, wymagającymi interwencji. Dziewczynki mogą wykazywać niedorozwój warg sromowych mniejszych. Inne zaburzenia obejmują migdałowaty kształt szpar powiekowych, wąskie czoło i gęstą ślinę. Ten zespół jest wynikiem braku funkcji genów przekazywanych przez ojca, znajdujących się w pozycji 15q11-13. Do utraty tego fragmentu materiału genetycznego może dojść na drodze trzech różnych mechanizmów (ryc. 10). Około 70% przypadków jest wynikiem delecji w regionie q11-13 chromosomu 15 przekazanej przez ojca. Disomia (tzn. dwa

chromosomy homologiczne pochodzą od tego samego rodzica) matczyna odpowiada za 25% przypadków. Nieprawidłowe utrzymywanie się piętnowania na chromosomie 15 pochodzącym od ojca odpowiada za pozostałe 5%.

Rozpoznanie PWS potwierdza się za pomocą analizy metylacji DNA, w trakcie której poszukuje się obecności odpowiedniego napiętnowania (metylacji) matczynych i ojcowskich chromosomów 15. Analiza wzorów metylacji DNA w regionie 15q11-13 umożliwia określenie pochodzenia rodzicielskiego badanych regionów i jest podstawą weryfikacji klinicznego rozpoznania PWS niezależnie od mechanizmu. Ponieważ FISH wykonana pod kątem delecji 15q11-13 wykrywa tylko 70% dotkniętych chorobą dzieci, preferowanym testem diagnostycznym jest metylacja DNA. Rutynowo zleca się także wykonanie analizy kariotypu w celu wykluczenia translokacji. Ryzyko ponownej ciąży z tym zespołem na ogół jest niskie, choć jego określenie może być skomplikowane. W przypadku, gdy rodzina chce poznać ryzyko wystąpienia tego zespołu w przyszłych ciążach, zaleca się poradnictwo genetyczne (nota od Wydawcy: patrz NeoReviews. 2005;6:e559-e566.)

**Zespół Beckwitha i Wiedemanna (BWS).** Jest to wrodzone zaburzenie prowadzące do nadmiernego wzrostu, charakteryzujące się przerostem języka, przerostem połowicznym, wadami ściany jamy brzusznej (przepukliną pierścienia pępkowego czy przepukliną pępowinową), hipoglikemią, bruzdami płatków usznych i dołkami na tylnej powierzchni małżowiny usznej (ryc. 11). Rozpoznanie opiera się na obecności trzech z klinicznych cech wymienionych powyżej. Do rozwoju BWS może dojść za pośrednictwem sześciu znanych mechanizmów, obejmujących szereg pięć-



RYCINA 11. Dziecko z zespołem Beckwitha-Wiedemana wykazujące gigantyzm, przerost języka oraz skorygowaną operacyjnie przepuklinę pierścienia pępkowego. U tego dziecka doszło do rozwoju wątrobiaka zarodkowego.

nowanych genów w pozycji 11p15.5, w tym dziedziczony ze strony ojca *IGF2*, który zwykle ulega nadmiernej ekspresji. Laboratoria kliniczne dysponują testami molekularnymi i wszystkie dzieci należy poddać analizie chromosomowej o wysokiej rozdzielczości w celu oceny rodzinnej translokacji. Około 20% pacjentów z BWS ma mutację rodzinną, którą można wykryć za pomocą anali-

zy molekularnej. Badania prenatalne obejmują ultrasonografię płodu oraz analizy molekularne/cytogenetyczne dla rodzin, w których stwierdzono występowanie tych zaburzeń. BWS występuje ze zwiększoną częstością w ciążach uzyskiwanych metodą zapłodnienia *in vitro*.

Ponieważ u 5-10% dzieci z BWS dochodzi do rozwoju raka nerki (guz Wilmsa), wątroby lub nadnerczy, rozpoznanie tego zespołu jest ważne, aby ustalić protokół badań przesiewowych pod kątem wystąpienia nowotworu. Zaleca się badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej oraz pomiar stężeń  $\alpha$ -fetoproteiny (AFP) w surowicy w chwili rozpoznania i co 3 miesiące do 4 r. ż., następnie co kwartał do 8 r. ż. badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej. Prawidłowe stężenia AFP w chwili urodzenia są bardzo wysokie i wartości referencyjne powinny być brane pod uwagę.

**Zespół Corneli de Lange.** Zespół Corneli de Lange charakteryzuje się ograniczeniem wzrostu w okresie płodowym i po urodzeniu oraz określonymi cechami twarzy obejmującymi zrosnięte, łukowate brwi, długie rzęsy, zadarte i skierowane do przodu nozdrza, długą rynienką podnosową, cienką wargę górną z centralnym wierzchołkiem. Osoby z tym zespołem mogą prezentować niedorozwój kończyn górnych, w tym oligodaktylię (brak palców). Praktycznie wszystkie dzieci mają refluks żołądkowo-przelykowy oraz problemy z odżywianiem. U wielu chorych występuje mutacja w genie *NIPBL*. Ponad 99% przypadków jest sporadycznych z niewielkim ryzykiem ponownej ciąży obciążonej tym zespołem, choć pojawiły się rzadkie doniesienia na temat rodzin z mutacją autosomalną dominującą.

**Zespoły przedwczesnego wzrostu kości czaszki związane z FGFR:** zespół Crouzona, Pfeiffera i Aperta. Większość chorych z tymi zespołami ma nowe mutacje autosomalnie dominujące w genie *FGFR2*. U wszystkich pacjentów występuje obustronne zarośnięcie szwu wieńcowego czaszki lub czaszka w kształcie trójlistnej koniczyny (ryc. 12). Zespoły te różnicuje się na podstawie zaburzeń dotyczących kończyn (tabela). Rozszczep podniebienia lub atrezja nozdrzy tylnych mogą być przyczyną niedrożności górnych



RYCINA 12. Zdjęcie pośmiertne dziecka z zespołem Pfeiffera. Należy zwrócić uwagę na czaszkę w kształcie trójlistnej koniczyny i szerokie, skręcone przyśrodkowo kciuk i paluch.



TABELA. Różnicowanie cech klinicznych zespołów przedwczesnego zrostu kości czaszki związanych z *FGFR*

Zespół	Dłonie	Kciuki	Stopy	Paluch
Crouzona	Prawidłowe	Prawidłowe	Prawidłowe	Prawidłowe
Pfeiffera	Syndaktylia różnego stopnia	Szerokie i skrócone przyśrodkowo	Syndaktylia różnego stopnia	Szeroki i skrócony przyśrodkowo
Aperta	Syndaktylia kości	Mogą być zrośnięte z palcami	Syndaktylia kości	Mogą być zrośnięte z palcami

Zmodyfikowane za [www.genetests.org](http://www.genetests.org) – patrz Piśmiennictwo



RYCINA 13. Typowe cechy asocjacji VATER, z lewostronnym niedorozwojem kości promieniowej, wadami kręgosłupa, atrezią odbytu oraz defektami kończyny dolnej. Dziecko miało ponadto wrodzoną wadę serca i jedną nerkę.

dróg oddechowych. Często występuje wytrzeszcz, który może prowadzić do uszkodzenia rogówki. W celu stwierdzenia zaburzeń w obrębie kręgosłupa należy wykonać RTG kręgosłupa oraz tomografię komputerową lub obrazowanie za pomocą rezonansu magnetycznego w celu oceny pod kątem wodogłowia. Większość chorych przed ukończeniem 2-3 miesiąca życia wymaga leczenia w ośrodku specjalizującym się w zaburzeniach dotyczących twarzoczaszki. Ryzyko ponownej ciąży z tymi zespołami zależy od tego czy jedno z rodziców jest nosicielem mutacji – jeżeli jest, wówczas ryzyko wynosi 50%. Diagnostyka prenatalna opiera się na badaniach ultrasonograficznych lub analizie molekularnej znanej mutacji.



RYCINA 14. Obustronne zniekształcenia kciuków u pacjentki z zespołem niedokrwistości Fanconiego po przeszczepieniu komórek pnia z powodu białaczki. U chorej początkowo rozpoznano asocjację VATER opierając się na wadach budowy kręgosłupa, kości przedramienia i nerek.

### Asocjacja VATER/VACTERLL

VATER/VACTERLL jest skrótem określającym występowanie nielosowego związku zaburzeń obejmujących wady kręgosłupa, atrezię odbytu, wrodzone wady serca, przetokę tchawiczo-przełykową, wady nerek, wady kości promieniowej oraz wady kończyn (vertebral, anal, cardiovascular anomalies, tracheoesophageal fistula, renal and/or radial abnormalities and other limb anomalies) (ryc. 13). Do rozpoznania wymagane jest występowanie trzech z tych zaburzeń. Zespół zwykle nie jest dziedziczny i nie wiąże się ze zmianami genetycznymi, choć coraz częściej występuje u dzieci kobiet z insulinozależną cukrzycą. Ponieważ podobne zaburzenia mogą towarzyszyć niedokrwistości Fanconiego (FA) (ryc. 14), należy brać pod uwagę możliwość występowania FA podczas ustalania rozpoznania, szczególnie jeśli występują wady kości promieniowej. FA jest chorobą nowotworową, dziedziczną autosomalnie recesywnie, rozpoznawaną na podstawie badań wykazujących zwiększoną częstość występowania złamań chromosomów. W przypadku jakichkolwiek podejrzeń co do rozpoznania FA zaleca się konsultację z genetykiem klinicznym.

Artykuł ukazał się oryginalnie w NeoReviews, Vol. 9, No 1, January 2008, p. e29. Common Dysmorphic Syndromed in the NICU, wydawanym przez American Academy of Pediatrics (AAP). Polska wersja publikowana przez Medical Tribune Polska. AAP i Medical Tribune Polska nie ponoszą odpowiedzialności za nieścisłości lub błędy w treści artykułu, w tym wynikające z tłumaczenia z angielskiego na polski. Ponadto AAP i Medical Tribune Polska nie popierają

stosowania ani nie ręczą (bezpośrednio lub pośrednio) za jakość ani skuteczność jakichkolwiek produktów lub usług zawartych w publikowanych materiałach reklamowych. Reklamodawca nie ma wpływu na treść publikowanego artykułu.

*Piśmiennictwo na str 98*

## Komentarz

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Krajewska-Walasek, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie



Artykuł autorstwa Bishara’ego i Clericuzio zatytułowany „Zespoły dysmorficzne często spotykane w oddziałach intensywnej terapii noworodków” można potraktować jako przegląd rzadkich zespołów dysmorficznych o ciężkim przebiegu, często letalnych w pierwszych dniach życia, z którymi, ze względu na ich charakter i przebieg, spotyka się neonatolog zatrudniony w oddziale intensywnej opieki medycznej. W tego rodzaju publikacji trudno zawrzeć wiele informacji. Autorzy sygnalizują więc jedynie najważniejsze objawy kliniczne, jakie mogą wystąpić w omawianych zespołach, przedstawiają krótko najnowsze możliwości diagnostyczne oraz telegraficznie informują o ryzyku powtórzenia się choroby u kolejnego dziecka i możliwościach diagnostyki prenatalnej.

Mimo swej skrótowej formy, artykuł zaznajamia nas z aktualnymi możliwościami diagnostycznymi, jakimi dysponuje obecnie genetyka kliniczna. Co więcej, przedstawia kolejne zespoły dysmorficzne w kontekście konieczności zasięgnięcia konsultacji genetyka klinicznego – w celu weryfikacji rozpoznania klinicznego i wyboru odpowiedniej techniki diagnostycznej. W sumie pozwala na zapoznanie się z ABC symptomatologii wybranych, ale zarazem podstawowych, zespołów dysmorficznych, na tyle odrębnych, że możliwych do rozpoznania przez każdego lekarza.

Bardzo wysoko oceniam załączone w pracy zdjęcia prezentujące większość omawianych zespołów. Warto tę pracę przeczytać kilka razy i bardzo dokładnie obejrzyć prezentowane fotografie.

Co to jest zespół dysmorficzny?

Zespoły dysmorficzne powstają w wyniku nieprawidłowej embriogenezy, a charakteryzują się odrębnością w wyglądzie twarzy. Najczęściej towarzyszy im opóźnienie rozwoju psychoruchowego (niepełnosprawność intelektualna) oraz wady innych narządów. Specjaliści w dziedzinie dysmorfologii, poza rozległą wiedzą teoretyczną, charakteryzują się szczególną umiejętnością

i zręcznością rozpoznawania tych zespołów, często „od pierwszego wejrzenia” (facial gestalt). Jedno spojrzenie doświadczonego klinicysty na twarz chorego pozwala mu powiedzieć wiele rzeczy na jego temat, np. ile ma palców u rąk, jaką ma prawdopodobnie wadę serca i w jakim genie należy szukać mutacji odpowiedzialnej za obserwowany zespół objawów.

Niekiedy dysmorfolog wyodrębnia zespół na podstawie szczególnej konstelacji/kombinacji objawów. Tak jest np. w przypadku zespołu Meckela i Grubera, uwarunkowanego autosomalnie recesywnie, a przebiegającego z obecnością przepukliny mózgowej, polidaktylii oraz torbielowatości nerek. Znajomość tego zespołu ma ogromne znaczenie dla poradnictwa genetycznego. W przypadku tego zespołu ryzyko powtórzenia się choroby wynosi aż 25%, natomiast w przypadku wystąpienia izolowanej otwartej wady cewy nerwowej ok. 5%.

Mimo iż znane są zestawienia/listy objawów dla poszczególnych zespołów, to rozpoznawanie tych zespołów z reguły polega na wychwyceniu przez klinicystę swoistego wyglądu twarzy. Tego zadania nie potrafi wykonać komputer. Osoby dotknięte tym samym zespołem wyglądają jak rodzeństwo.

W przypadku uczenia się nowego zespołu, należy przede wszystkim zapamiętać go (musi „wpaść w oko”) i następnie próbować znaleźć wśród badanych. Opisy w światowym piśmiennictwie określonych zespołów dysmorficznych znakomicie poprawiają utrwalenie się obrazu twarzy tych chorych w naszej pamięci. Przy rozpoznawaniu przez facial gestalt, trzeba próbować wyłowić z twarzy dwie lub trzy najbardziej charakterystyczne cechy – nieraz nawet trudne do wyrażenia słowami.

Popatrzmy na załączone do artykułu zdjęcia.

W przypadku trisomii 18 brak niestety swoistości w wyglądzie twarzy. W wysunięciu rozpoznania, obok licznych nieprawidłowości i towarzyszącego ciężkiego

stanu noworodka, pomaga nam obecność hipertonii (proszę zwrócić uwagę na wyprostne ułożenie ciała, objaw niespotykany u zdrowego noworodka), duże uszy z wygładzonym obrąbkiem (przypominające ucho nie-toperza), a u dziewczynek przerośnięta łechtaczka, imitująca obojnactwo rzekome męskie. U noworodków z trisomią 13 doskonale ułatwiają rozpoznanie defekty skóry (brak skóry, jakby skalp) na owłosionej części czaszki.

Niemożliwe wręcz jest zaobserwowanie u noworodka triploidii, która zazwyczaj jest cechą letalną (ryc. 4). Obok triploidii (obecność w komórce dodatkowego zestawu chromosomów zwiększającego ich całkowitą liczbę do 69) obserwuje się jeszcze tetraploidię (czterokrotne zwiększenie haploidalnej liczby chromosomów). Triploidia (zapis kariotypu: 69,XXY – stwierdzany najczęściej; 69,XXX lub 69, XYY) powstaje zazwyczaj w wyniku zapłodnienia komórki jajowej przez dwa plemniki (dispermia) lub w wyniku braku podziału dojrzałej komórki jajowej lub plemnika, wskutek czego powstaje diploidalna gameta. Występuje w 1% zarodków oraz w 20% poronień samoistnych. Opisano zaledwie 7 przypadków tetraploidii u noworodków pochodzących z 40-tygodniowych ciąż. Częściej u noworodków można zaobserwować mozaikowość tetraploidii i diploidii, którą można potwierdzić tylko za pomocą badania cytogenetycznego wykonanego w fibroblastach skóry. Noworodek taki wykazuje dość charakterystyczną dysmorfie twarzy (hiperteloryzm, małoocze, szczelina ętczówki, duże tylne ciemię, niski grzbiet nosa, rozszczep wargi – rzadko, nisko osadzone i zniekształcone uszy-płatek taśmowaty), syndaktylię 3 i 4 palca dłoni – wadę swoistą dla tetraploidii, przewężenie dłoni (w części środkowej śródreżca), wadę serca i wiele innych wad. Ryzyko powtórzenia się tej nieprawidłowości jest małe.

Do pilnego zapamiętania jest również wygląd stóp w zespole Turnera (ryc. 7). Zeńska płeć dziecka, nadmiar skóry na karku i wreszcie stopy z obrzękniętym grzbietem i paluszkami oraz przewężeniami, przypominającymi poprzewiązywane w poprzek sznurkiem parówki, pozwalają na szybkie ustalenie rozpoznania.

Zespół Beckwitha i Wiedemanna, którego genetyka jest bardzo złożona, nie należy do zespołów o najcięższym przebiegu, ale ze względu na tendencję do powstania nowotworu warto o nim pisać. Ten zespół można stosunkowo łatwo wykryć u noworodków w pierwszych dniach życia. Choroba charakteryzuje się dużą masą urodzeniową (powyżej 4000 g) – zaliczana jest do chorób przebiegających z gigantyzmem, ol-

brzymim językiem (makroglossia), powiększeniem narządów wewnętrznych (visceromegalia), bruzdami promienistymi na płatku usznym oraz rozstępem mięśni prostych brzucha. Wraz z wiekiem niektóre cechy choroby zanikają, inne stają się na tyle mniej charakterystyczne, że rozpoznanie jej przedstawia duże trudności. Niewykryta w okresie noworodkowym i nieleczona hipoglikemia prowadzi do niedorozwoju umysłowego. Zaniedbanie wczesnej diagnostyki molekularnej nie pozwala na wyodrębnienie grupy chorych szczególnie narażonych na ryzyko wystąpienia nowotworów (przypadki sporadyczne z izodisomią ojcowską). Zespoły mikrodelecji (opisane w publikacji mikrodelecja 7q11.2 oraz 22q11.2), w tym również będący wynikiem zaburzonego rodzicielskiego piętnowania genomu (m.in. przez mikrodelecję w regionie q11-13 na chromosomie 15 pochodzącym od ojca) zespół Pradera i Williego są już społeczności pediatrycznej w Polsce szeroko znane, czego wyrazem są liczne przypadki chorych dzieci, w tym noworodków kierowanych trafnie na badania z wykorzystaniem techniki FISH.

Ciekawe, że autorzy pominieli w omawianej publikacji ciężką, zazwyczaj letalną postać zespołu Smitha, Lemlego i Opitza (SLO), który jest chorobą metaboliczną spowodowaną dziedzicznym defektem biosyntezy cholesterolu, powstałym w wyniku mutacji w genie DHCR7, kodującym reduktazę 7-dehydrocholesterolu. Deficyt aktywności DHCR7 odpowiedzialny jest za uogólniony niedobór cholesterolu (CH) oraz gromadzenie się jego bezpośredniego prekursora, 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) we wszystkich komórkach organizmu. Weryfikację rozpoznania klinicznego przeprowadza się za pomocą badań biochemicznych i diagnostyki genetycznej. Analiza biochemiczna polega na oznaczaniu 7-, 8-DHC i CH w surowicy oraz stosunku 7 (8)-dehidropregnantriolu do pregnantriolu w jednorazowej porcji moczu metodą GC/MS. W badaniach prenatalnych tzw. inwazyjnych oznaczenia 7-, 8-DHC i CH wykonywane są w wodach płodowych (w 15 Hbd), natomiast w tzw. nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej markerami choroby u płodu są 7-dehydrometabolity steroidowe pochodzenia płodowego (7-dehidropregnantriol oraz 8-dehydroestriol) stwierdzane (od 12 Hbd) w moczu matki. Uzupełnieniem diagnostyki jest identyfikacja mutacji w genie DHCR7, którą można wykorzystać w badaniach prenatalnych (biopsja kosmówki w 11 Hbd).

Zespół SLO przebiega w postaci mnogich wad wrodzonych o szerokim i zmiennym zakresie objawów (od postaci łagodnych do przypadków letalnych) ze współistniejącym – jako objaw stały – opóźnieniem umysłowym.



Wśród głównych objawów zespołu SLO należy wymienić: bardzo charakterystyczny wygląd twarzy, małowłowie, zaburzenia wzrastania, u chłopców obojnactwo rzekome męskie, wady rozwojowe kończyn (m.in. syndaktylia 2 i 3 palców stóp), wady nerek (torbielowość), serca (m.in. AVSD) i przewodu pokarmowego (zwężenie odźwiernika, choroba Hirschsprunga), zaburzenia neurologiczne oraz niedorozwój umysłowy, najczęściej znacznego stopnia.

W letalnym zespole SLO dodatkowo obserwuje się olbrzymie nadnercza, przerost komórek wysp Langerhansa w trzustce, płuca jedнопłatowe, rozszczep podniebienia, uszkodzenie wątroby, zaćmę. W pojedynczych przypadkach stwierdzono nawet holoprocencefalię oraz ubytkowe wady kończyn. Z uwagi na ww. zaburzenia rozwojowe zespół SLO w swej ciężkiej postaci charakteryzuje się wysoką śmiertelnością – w ciągu pierwszego roku życia umiera ok. 20% chorych.

Konieczność wczesnego rozpoznania choroby ma duże implikacje dla poradnictwa genetycznego, ponieważ choroba dziedziczy się autosomalnie recesywnie, z 25% ryzykiem powtórzenia. Własne badania przesiewowe wykonane w populacji polskich noworodków pozwalają przypuszczać, że w naszej populacji zespół SLO jest jedną z najczęstszych chorób metabolicznych oraz że częstość występowania choroby na terenie Polski może być wyższa niż w innych populacjach europejskich. Badania prowadzone przez Zakład Genetyki Medycznej IP-CZD we współpracy z Polskim Rejestrem Wrodzonych Wad Rozwojowych (PRWWR), mające na celu zbadanie częstości choroby w Polsce przez prospektywną identyfikację wszystkich nowych przypadków tego zespołu w latach 2006-2008 (chorobę próbowało rozpoznać ponad 2000 lekarzy, przede wszystkim neonatolodzy i pediatrzy), nie wykazały takiej zależności. Przypuszczamy, że niska częstość choroby uzyskana w powyższych badaniach w pewnej mierze związana jest z faktem bardzo wczesnej śmierci noworodka, przed ustaleniem rozpoznania.

Na zakończenie o możliwościach diagnostycznych. W artykule podkreśla się wagę rozpoznania klinicznego, które warunkuje wybór właściwej techniki diagnostycznej. Choroby jednogenowe (prezentowany zespół Meckela i Grubera oraz zespoły kraniosynostozy czy zespół SLO) weryfikuje się za pomocą metod analizy DNA bądź biochemicznej/enzymatycznej. W przypadku aberracji chromosomowych, takich jak trisomia 21, trisomia 18 i 13, wykorzystywane jest klasyczne badanie cytogenetyczne (analiza 400-550 prążków w chromosomach metafazalnych), które cechuje małą

rozdzielczość (nie można identyfikować nieprawidłowości struktury chromosomów mniejszych niż ok. 5 milionów par zasad). Zespoły mikrodelecji można próbować diagnozować za pomocą tzw. techniki uzyskiwania dużej rozdzielczości obrazu prążkowego chromosomów – HRT (high resolution technique), która rozpoznaje mniejsze (tzw. submikroskopowe o wielkości ok. 2-3 milionów par zasad) nieprawidłowości strukturalne chromosomów niż te, które można zidentyfikować przy zastosowaniu klasycznej analizy chromosomów metafazalnych. Technika HRT umożliwia badanie chromosomów prometafazalnych, które są o wiele dłuższe i wykazują znacznie bogatszy (550-1250 prążków) obraz prążkowy niż chromosomy metafazalne. Metodą z wyboru do diagnostyki zespołów mikrodelecyjnych mniejszych niż 2 miliony par zasad jest technika FISH. Warto podkreślić, że podstawą rozpoznawania mikrodelecji jest wysunięcie podejrzenia mikrodelecji określonego chromosomu przez klinicystę i zastosowanie swoistej sondy. Wspomniana w artykule technika aCGH, czyli CGH do macierzy klonów sekwencji DNA, ma szansę w przyszłości stać się metodą z wyboru przy poszukiwaniu wszelkich zmian w genomie. Jak dotychczas ma jednak ograniczone znaczenie diagnostyczne, ponieważ nie jest dostępna w większości laboratoriów ze względu na bardzo wysokie koszty.

W stawianiu rozpoznania i następnie wyborze odpowiedniej techniki diagnostycznej weryfikującej to rozpoznanie, zrozumieniu istoty choroby, podjęciu odpowiedniej terapii i udzieleniu rzetelnej porady genetycznej, pomagają nam komercyjnie dostępne komputerowe programy diagnostyczne (POSSUM/OSSUM, LDD: London Dysmorphology Database) oraz powszechnie dostępne strony internetowe dedykowane tym zagadnieniom (PubMed, OMIM, GeneReviews).

## Piśmiennictwo

- Jones KL. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations. 6th edn. WB Saunders Company, Philadelphia 2006.
- Krajewska-Walasek M. Genetyka wad wrodzonych. W: Chirurgia noworodka, Kaliciński P. (red.). Invest-Druk, Warszawa 2004:25-65
- Krajewska-Walasek M. Dziecko z dysmorfją: wczoraj i dziś. *Pediatr Pol.* 2008; 83: 604-612.
- London Dysmorphology Database (LDDb). [www.hgmp.mrc.ac.uk/DHMHD/lddb](http://www.hgmp.mrc.ac.uk/DHMHD/lddb)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)
- Pictures of Standard Syndromes & Undiagnosed Malformations (POSSUM) <http://www.possu.net.au/libaccess.lib.mcmaster.ca/pub/manual.doc>
- Puri RD, Verma IC. Dysmorphology diagnosis. *Indian J Pediatr* 2004; 71:535-5399