

Síndrome de bilis espesa en un neonato con Síndrome de Beta-Talasemia Menor. Reporte de caso y revisión de la literatura

Thick bile syndrome in a neonate with Beta-Thalassemia Minor Syndrome. Case report and literature review

Armando Quero Hernández¹
Romeo Zárate Aspiros²
Alejandro Quero Estrada³
Ulises Reyes Gómez⁴
Rubén M. Álvarez Solís⁴
Irene Mijangos Cruz⁵

RESUMEN

Introducción. El síndrome de Beta-Talasemia, se caracteriza por alteración de la cadena beta de la globulina. El síndrome de bilis espesa o tapón de bilis definida como una obstrucción extrahepática de los conductos biliares en recién nacidos de término, sin que tengan anormalidades anatómicas o defectos bioquímicos. Ambas entidades pueden dar origen a hiperbilirrubinemia neonatal. La baja presentación y poca incidencia en la asociación de estos dos síndromes en la etapa neonatal fue motivo para realizar la descripción del caso clínico y revisar la literatura.

Caso clínico. Neonato masculino de término, con 5 días de vida extrauterina. Padecimiento actual lo inició a pocas horas de nacido al notar tinte icterico progresivo en conjuntivas. Exploración física a su ingreso con tinte icterico generalizado (Kramer VI). Analítica hemática y de función hepática con anemia severa, e hiperbilirrubinemia mixta. Electroforesis de hemoglobina: Hb A1 44.5%, Hb F 54.7%, Hb A2 0.8%.

Discusión. En este caso hemos descrito la asociación de beta talasemia menor y el síndrome de bilis espesa, que presentó un cuadro significativo de hiperbilirrubinemia mixta, sobre todo de la fracción directa con mínima morbilidad. Cursando evolución favorable con la terapia de hidratación, ácidoursodesoxicólico, transfusión de concentrados eritrocitarios, y a 8 semanas de su egreso los valores de bilirrubina total son de 2.5gr/dl y la fracción directa 0.5 gr/dl.

Palabras clave: Síndrome Beta-talasemia; Síndrome de bilis espesa.

Fecha de recibido: 12 de noviembre de 2018

Fecha de aceptación: 13 de febrero de 2019

1 Académico de la Academia Mexicana de Pediatría. Adscrito a la División de Pediatría del Hospital General "Dr. Aurelio Valdivieso".

2 Jefe de Urgencias Pediátricas del Hospital General "Dr. Aurelio Valdivieso".

3 Estudiante de Pre-grado de la Facultad de Medicina y Cirugía de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca.

4 Académico de la Academia Mexicana de Pediatría.

5 Enfermera Adscrita al Servicio de Hematología-Oncología Pediátrica del Hospital General "Dr. Aurelio Valdivieso".

ABSTRACT

Introduction. The Beta-Thalassemia syndrome, where there is alteration in the production of the beta chain of globulin. The thick bile syndrome or bile plug defined as an extrahepatic obstruction of the bile ducts in term newborns, without having anatomical abnormalities or biochemical defects. Both entities can give rise to neonatal hyperbilirubinemia. The low presentation and low incidence in the association of these two syndromes in the neonatal stage was reason to make the description of the clinical case and review the literature

Clinical case. Male term newborn, with 5 days of extrauterine life. Current condition began, a few hours after the birth to note icteric conjunctival dye and was progressive. Physical examination at admission with generalized jaundice (Kramer VI). Hematical and liver function tests with severe anemia and mixed hyperbilirubinemia. Hemoglobin electrophoresis: Hb A1 44.5%, HbF 54.7%, Hb A2 0.8%

Discussion. In this case we have described the association of beta thalassemia minor and thick bile syndrome, wich presented a significant picture of mixed hiperbilirubinemia, especially of the direct fraction with minimal morbidity. Undergoing favorable evolution with hydration therapy, ursodeoxycholic acid, transfusion of erythrocyte concentrates, and at 8 weeks of discharge the total bilirubin values are 2.5 gr/dl and the direct fraction 0.5 mg/dl.

Keywords: Beta-Thalassemia syndrome; Thick bile syndrome.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Beta-Talasemia, engloba a un grupo heterogéneo de enfermedad hemolítica hereditaria, en donde hay ausencia en la producción de la cadena beta de la globulina o disminución en su síntesis.¹ Lo que determinará la expresión clínica de la enfermedad: y así se describen a la Talasemia mayor, intermedia y menor, además de otras beta-talasemias en asociación con variantes de hemoglobina como la HbC, HbS, HbE y la persistencia de la hemoglobina fetal.² Se han reportado más de 200 mutaciones puntuales en el gen de la beta globina, que son responsables en gran medida de la gran variabilidad, severidad y distribución étnica de la enfermedad.^{1,3} La beta-talasemia, clínicamente se manifiesta con una anemia cuya morfología es microcítica e hipocromía, ictericia y hepato y/o esplenomegalia. La talasemia mayor e intermedia, que pueden ser homocigota heterocigota, presentan manifestaciones clínicas desde muy temprana edad y con frecuencia requieren transfusión de eritrocitos. Presentan diversas complicaciones a lo largo de su evolución, que pueden ser inherentes a la enfermedad o bien derivadas al tratamiento, entre otras se han descrito: trastornos endocrinológicos que pueden condicionar retardo del crecimiento, diabetes mellitus o hipofunción gonadal; deformidad ósea como resultado

de la hiperplasia hematopoyética, la deformidad sobre todo de los huesos largos y de la región craneofacial; disfunción hepática por fibrosis y cirrosis, miocardiopatía dilatada o arritmias por sobrecarga de hierro, entre otras alteraciones.^{4,5}

En las salas de neonatología, con frecuencia se observan neonatos con hiperbilirrubinemia rápidamente progresiva, entre las causas se han identificado la incompatibilidad al sistema ABO, defectos hereditarios de la membrana del eritrocitos (esferocitosis), deficiencias enzimáticas intraeritrocíticas, hemoglobinopatías estructurales (anemia de células falciformes) y de síntesis (Síndromes talasémicos), así como aquellos determinados por proceso infeccioso viral o bacterianos.^{6,7}

El síndrome de bilis espesa o tapón de bilis, definida como una obstrucción extrahepática de los conductos biliares en recién nacidos de término, sin que tengan anomalías anatómicas, defectos bioquímicos, congénitos o lesiones hepatocelulares. Situación clínica que da origen a cuadro de ictericia obstructiva, históricamente esta patología poco frecuente observarla en la etapa neonatal, ocurría más frecuentemente en niños mayores con hemólisis crónica, fibrosis quística, resección ileal, anomalías congénitas del árbol biliar o errores innatos del metabolismo. Los reportes en la etapa neonatal asociados

a beta talasemia son extremadamente raros y representa un reto el establecer el diagnóstico.^{8,9}

La baja presentación y poca frecuencia en la asociación de estos dos síndromes en la etapa neonatal fue el motivo para realizar la descripción del caso clínico y revisar la literatura.

CASO CLÍNICO

Se trató de un neonato masculino de término, con 5 días de vida extrauterina. Madre de 26 años, sana. Padre de 33 años, sano. Sin consanguinidad ni antecedentes heredofamiliares de patología hematológica. Con grupo sanguíneo 0 Rh positivo. Morbilidad materna durante el embarazo solamente infección urinaria. Recibió profilaxis con ácido fólico y fumarato ferroso a partir del 2º mes del embarazo y negativo a transfusiones. Antecedentes perinatales: producto del tercer embarazo, normoevolutivo, serología viral materna negativa, adecuado control prenatal. Nace de parto eutócico en su unidad médica de adscripción, con peso al nacer de 4.5 kg, talla 51 cm., calificado con Apgar 9-9 y Capurro de 39 semanas de edad gestacional. Egresando al binomio a las 12 horas de su nacimiento.

Su padecimiento actual lo inició, según lo refiere la madre, a las pocas horas del nacimiento al notar tinte icterico en conjuntivas y que fue progresivo. Acudió al tercer día a su centro de salud para la realización del tamiz neonatal, donde recomendaron baños de sol. Dos días después se torna irritable y mayor coloración icterica, además de fiebre, por lo que fue enviado a nuestra institución.

Exploración física a su ingreso se apreció neonato masculino, reactivo. Normocéfalo con tinte icterico generalizado (Kramer VI), mucosa oral deshidratada. Adecuada dinámica ventilatoria, con saturación arterial de oxígeno de 93%. El abdomen blando, sin palpase visceromegalias.

Estudios de laboratorio al ingreso: Biometría hemática completa (BHC) con Hb 4.4 gr/dl, Hto 13.5%,

VCM 130 fl, HCM 41 pg, índice de distribución eritrocitaria 16%, reticulocitos 19% (cuenta corregida de retis 5.7%), leucocitos de 34,530/mm³, linfocitos 28% (9,668), monocitos 1%(345), eosinófilos 1% (345), basófilos 1% (345), neutrófilos 65% (22,244), mielocitos 4% (1,381), bandas 4% (1,381); plaquetas 356,000 xmm³. Hemotipo 0 y Rh positivo, idénticos al de la madre. Dispersograma de sangre periférica anormal, con predominio de la celularidad del área de “debris” que se prolonga y desplaza a los elementos linfoides y mieloides. El histograma de eritrocitos con una amplia base de la curva, denotando importante anisocitosis (figura 1) Frotis de sangre periférica con 50% de normoblastos, basofilia difusa, macrocitosis, microcitosis, eliptocitos y esquistocitos y 16% de reticulocitos.

El tiempo de protrombina 14 seg., parcial de tromboplastina 34 seg., fibrinógeno 285mg/dl. Las pruebas de función hepática (PFH) con bilirrubina total de 55.5 mg/dl, directa 44.5mg/dl, indirecta 11mg/dl. Aspartatoaminotransferasa de 114 UI/L, alaninaminotransferasa de 31UI/L, gama glutamiltransferasa 92UI/L, deshidrogenasa láctica de 4,415u/l, proteínas totales de 7.1gr/dl, albúmina 4 gr/dl. Serología Torch con IgG antirubeola 277.5 (vr menor de 0.10), IgG anticitomegalovirus 217 (vr menor 0.5). Nivel de haptoglobina sérica 7.9 mg/dl (vr 30-200mg/dl). Prueba de Coombs directa e indirecta negativa. Fragilidad osmótica negativa. Electroforesis de hemoglobina tomada previo a la transfusión sanguínea: HbA1 44.5%, HbF 54.7%, HbA2 0.8% (figura 2).

El ultrasonido de Hígado y vías biliares con hepato y esplenomegalia leve, variante anatómica en gorro frigio vesicular y escaso líquido libre subhepático.

El tratamiento consistió en hidratación a su ingreso, la administración de ácido ursodesoxicólico y transfusión de concentrado eritrocitario, además de profilaxis con vitamina K. Egresando a las dos semanas de su ingreso con: Hb de16.8gr/dl, VCM 87 fl, bilirrubinas totales de 8.5, directa 3.6 gr/dl, indirecta 5.2 gr/dl. Durante 10 meses que lleva de seguimiento ha requerido trans-

fusión de concentrados eritrocitarios por anemia severa, asociado con reticulocitosis, hiperbilirrubinemia indirecta en rangos de 6 a 9 mg/dl y la morfología eritroide con

VCM 76fl, HCM 28 pgr y la última electroforesis de hemoglobina realizada a los 8 meses de edad con HbA1 88%, HbA25% y Hb Fetal 7%.

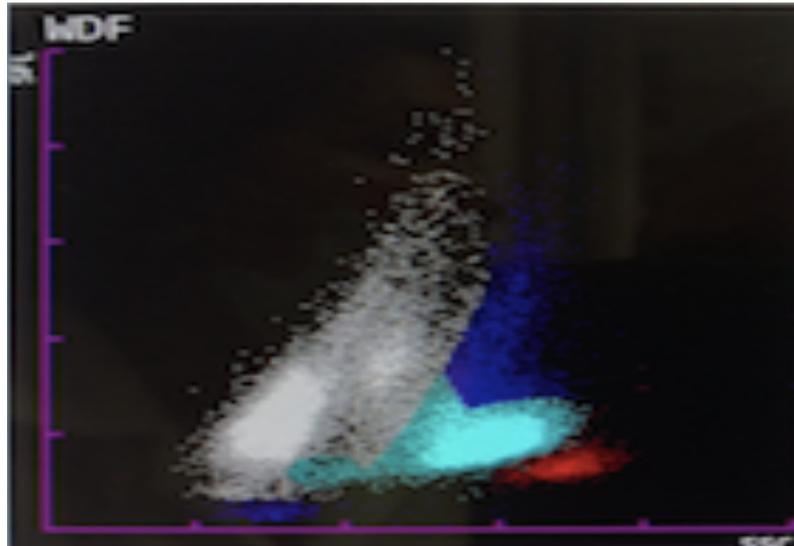


Figura 1. Esta imagen corresponde al dispersograma de la serie mieloide, cuya distribución espacial es anormal por la normoblastemia.

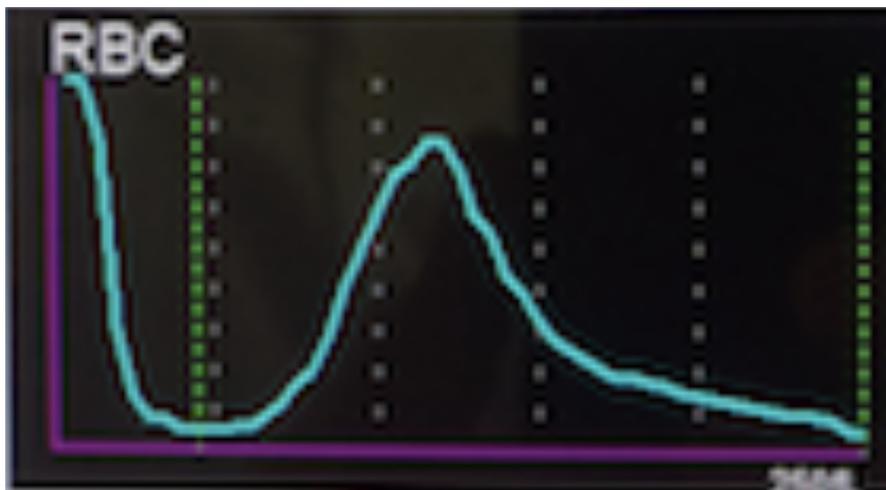


Figura 2. Histograma eritroide, cuyo vértice tiene un valor de 130 fl, sin embargo hay una gran variabilidad en la base, por una población celular eritrocitoide de microcitos y macrocitos.

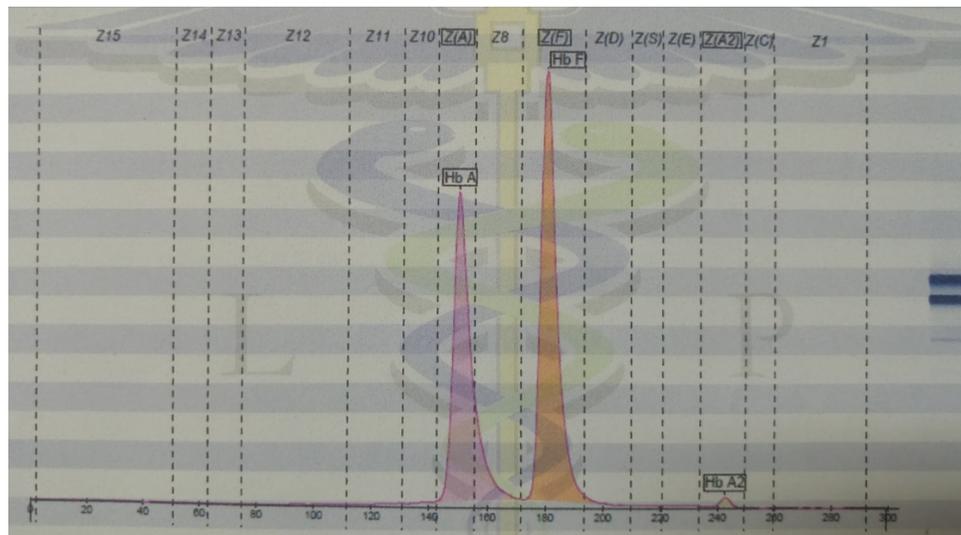


Figura 3. Corrido electroforético en la que se aprecia disminución de la HbA1, HbA2 e incremento de la HbF.

DISCUSIÓN

Desde la introducción de la profilaxis con inmunoglobulina anti-D en mujeres Rh negativa, la frecuencia de enfermedad hemolítica del recién nacido ha disminuido, sin embargo los eventos hemolíticos en esta etapa de la vida siguen presentes y sus causas de hemólisis neonatal se han diversificado y ello representa sin duda alguna un reto al diagnóstico.

Al interpretar los valores que determina el análisis por citometría de flujo de la sangre periférica del neonato, en particular de los diversos índices eritrocíticos, debemos considerar ciertas características inherentes de dichas células, propias únicamente en el recién nacido. Durante la hematopoyesis fetal, el volumen corpuscular medio (VCM) llegar a ser de 150 a 180 fl y el diámetro y volumen eritrocitario disminuye a través de la gestación para llegar a ser de 110 a 120 fl al nacimiento y durante el primer año de la vida continúa disminuyendo y hasta el año de vida alcanza el tamaño del adulto. Es normal observar una marcada variabilidad en la forma eritroide neonatal, las más comunes son dacriocitos, estomatocitos, esquistocitos, espinocitos, dianocitos. Aunado al ta-

maño eritroide, existe menor grado de formabilidad por su mayor viscosidad citoplasmática, mayor contenido de hemoglobina corpuscular media (HCM), que es de 34 a 41 pcgr., y cierta rigidez de la membrana celular, todas estas propiedades llevan a una pérdida eritroide por aumento de su secuestro esplénico y disminución de su vida media. Dependiendo de la edad gestacional, el mayor contenido de la hemoglobina del neonato es de tipo fetal (60 a 90%), cuya propiedad es la de ser más resistente a la desnaturalización a medios ácidos, y le confiere la propiedad de tener mayor afinidad al oxígeno, desviando su curva de disociación a la izquierda. Otra característica importante del eritrocito neonatal es su aumento al daño por sustancias oxidantes con inestabilidad del glutatión, formación de cuerpos de Heinz y metahemoglobinemia. Este aumento en la susceptibilidad al daño oxidativo origina hemólisis cuando la hipoxia o acidosis está presente en el contexto clínico del neonato. Todas estas características del eritrocito neonatal condicionan que su vida media sea de 60 a 90 días.¹⁰

El caso aquí descrito, presentó diversas características eritroides, propias de la etapa neonatal como la aniso-poiquilocitosis, macrocitosis e hiperchromia, además

de datos indirectos de proceso hemolítico como puede observarse en la reticulocitosis, incremento significativo de la deshidrogenasa láctica y la hiperbilirrubinemia indirecta, disminución de la haptoglobulina sérica. Es oportuno señalar los aspectos morfológicos de hemolisis, como son la basofilia difusa, punteado basófilo y la eritroblastosis de sangre periférica, además el histograma del eritrocito, si bien registró un VCM de 130 fl, presentó una amplia base y con predominio de la población microcítica. Lo que orientó al diagnóstico de beta talasemia fue precisamente esta anisocitosis y el valor del IDE en rango normal. El diagnóstico de beta talasemia menor fue corroborado por la alteración en los valores del corrido electroforético de la Hb: disminución de la HbA1, aumento de la HbF y disminución de la HbA2. Esta alteración en el patrón cuaternario de la estructura de la hemoglobina, genera un aumento de la alfa globulina que tiende a aglomerarse en el interior del eritrocito y a ser depurado por el sistema macrófago-monocitario, o bien su apareamiento con la gama globulina y explicar el incremento de la hemoglobina fetal. En la etapa neonatal es difícil separar la HbF, que normalmente está elevada, de la que surge en el contexto de las hemoglobinopatías, sin embargo el proceso clínico del paciente fue orientador, durante un seguimiento de 10 meses ha requerido transfusión de hematíes, con datos indirectos de hemolisis y el último estudio electroforético de la hemoglobina realizado a los 8 meses de edad y 3 meses después de la última transfusión tiene un incremento de la HbA2 y discretamente elevada la HbF. Entre otras posibles causas de anemia investigadas en este caso clínico y que fueron descartadas están la serología viral, fragilidad osmótica y la prueba de Coombs. No fue posible realizar el estudio molecular del caso en nuestra institución.

Al paciente clínicamente se le observó con un tinte icterico verde-amarillento generalizado, distensión abdominal, ausencia de acolia y coluria. De las pruebas de función hepática con hiperbilirrubinemia, predominó la bilirrubina directa, que a su ingreso fue de 44.5 mg/dl y de la indirecta 11 mg/dl, que planteó como primer posi-

bilidad algún problema de tipo obstructivo congénito, sin embargo el reporte ultrasonográfico (USG) descartó tal posibilidad al demostrar integridad de la vía biliar intra y extrahepática, además de que no existió alteración de las diversas transaminasas. Por lo que se consideró el diagnóstico de síndrome de bilis espesa asociada a evento de crisis de hemolisis de la beta talasemia.

El incremento de la cifra de bilirrubina directa y que ésta represente más del 20% de la hemoglobina total y ocurra en los primeros 30 días de vida extrauterina se le designa como colestasis neonatal. La colestasis neonatal tiene una incidencia de 1 caso en 2,500 nacimientos y las principales causas son atresia biliar, hepatitis neonatal y menos común la deficiencia de alfa 1 antitripsina. El síndrome de bilis espesa, es una causa poco frecuente de ictericia neonatal. La incidencia se estima de 1 caso por 175 000 nacidos vivos y ha representado el 8% aproximadamente de los eventos quirúrgicos neonatales.¹¹ De los pocos casos descritos en esta etapa se han asociado a hemorragias intraabdominales, retroperitoneales e intracraneales, aumento de la circulación enterohepática, en enfermedades como Hirschprung, estenosis o atresia intestinal. Entre otros factores precipitantes se han señalado en la literatura: sepsis, alimentación con nutrición parenteral total, prematuridad, terapia con diuréticos, deshidratación, y alteraciones en la composición de los fluidos corporales, tales como la fibrosis quística.⁸ En el 10% de los casos de anemia hemolítica se ha observado el desarrollo de colestasis, en particular con la incompatibilidad Rh, ABO, esferocitosis, deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.^{8, 9, 12} Aquí describimos al parecer el primer caso en nuestro país de la asociación de una beta talasemia menor y síndrome de bilis espesa en un neonato temprano.

Las manifestaciones clínicas descritas como la intolerancia a la vía oral, ictericia generalizada, distensión abdominal, con hepatoesplenomegalia, las transaminasas normales o discretamente elevadas y la colestasis suelen durar hasta cuatro semanas o más. En los reportes de estudios histopatológicos han observado proliferación de

células gigantes y de los conductos biliares, además de hematópoyesis extramedular. La fisiopatogenia se hipotetiza como secundario a una alteración del flujo sanguíneo a nivel canalicular, que limita la velocidad de depuración de la bilirrubina y en otras ideas también se considera que existe un trastorno en su composición bioquímica.⁸

El análisis ultrasonográfico de este síndrome, contribuye de gran manera al diagnóstico, habitualmente la describen con dilatación de la vesícula biliar, lodo biliar espeso, como material ecogénico interno sin sombras acústicas. Aunque estos hallazgos no son patognómicos ya que son observados también en la obstrucción parcial o completa de los conductos biliares.^{13,14}

El tratamiento es muy variado; hay descripciones de casos con resolución espontánea, otras son intervencionistas aplicando colecistostomía percutánea y lavado con solución fisiológica, también la asociación de N-acetilcisteína más glucagon durante la colangiografía percutánea, o bien con ácido ursodesoxicólico e hidratación del paciente.¹⁵⁻¹⁷ En nuestro caso, el tratamiento consistió básicamente en hidratación con líquidos parenterales al inicio a 120ml hasta llegar 180ml/k/día, vigilando datos de sobrecarga hemodinámica, además de ácido ursodesoxicólico y el tratamiento de la anemia severa con transfusión de eritrocitos.

El diagnóstico de síndrome de bilis espesa por lo general no es considerado por su baja frecuencia, sin embargo la clínica es orientadora, ya que una ictericia significativa como el de nuestro caso, con un franco tinte verdoso a los siete días de vida, que no es usual en la colestasis neonatal, además de su buen estado general y la analítica de sangre periférica, orienta a un evento de hemólisis y la medición de la electroforesis de hemoglobina a los 8 meses de edad en la que persiste alteración en los niveles de HbF y HbA2 fue lo que nos permitió el diagnóstico.

En resumen, en este caso, hemos descrito la asociación de beta talasemia menor y el síndrome de bilis espesa, que presentó un cuadro significativo de hiperbi-

lirrubinemia mixta, sobre todo de la directa con mínima morbilidad. Cursando con una evolución favorable con la terapia de hidratación, acidoursodesoxicólico, transfusión de concentrados eritrocitarios, y a 4 semanas de su egreso los valores de bilirrubina total fueron de 8.5gr/dl y la fracción directa 3.5 gr/dl.

REFERENCIAS

1. Renzo Galanello, Raffaella Origa. Beta-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010;5:11.<http://www.ojrd.com/content/5/1/11>.
2. Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2018; 32(2): 193-211.
3. Traivaree C, Monsereenusom C, Rujkijanont P, Prasertsin W, Boonyawat B. Genotype-phenotype correlation among beta-thalassemia and beta-thalassemia/HbE disease in Thai children: predictable clinical spectrum using genotypic analysis. J Blood Med. 2018; 10(9):35-41.
4. Aessopos A, Farmakis D, Deftereos S, Tsironi M, Tassiopoulos S, Moysakakis I et al. Thalassemia heart disease: a comparative evaluation of thalassemia major and thalassemia intermedia. Chest. 2005; 127(5): 1523-30.
5. Dhouib NG, Ben Khaled M, Ouederni M, Besbes H, Kouki R, Mellouli F et al. Growth and endocrine function in Tunisian Thalassemia major patients. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2018; 10(1):e2018031.[doi:10.4084/MJHID.2018.031](https://doi.org/10.4084/MJHID.2018.031).
6. Khalaf R, Phen C, Karjoo S, Wilsey M. Cholestasis beyond the neonatal and infancy periods. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr. 2016; 19(1): 1-11.
7. Weiss AK, Vora PV. Conjugated hyperbilirubinemia in the neonate and young infant. Pediatr Emerg Care. 2018; 34(4): 280-283.
8. Maltos Wilfredo, Garza Arturo, Ochoa Ma. Guadalupe, Pérez Rogelio Rodríguez, Rodríguez Isaías, et al. Caso clínico atípico del síndrome de bilis espesa. Rev Mex Ped. 2002; 69(1):29-31.

9. Woo Young J, Min Jeng C, HyeSeung H, Sun Hwan B. Use of omega-3 polyunsaturated fatty acids to treat inspissated bile syndrome: a case report. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2016; 19(4):286-290.
10. Patrick G. Gallagher. The neonatal erythrocyte and its disorders. In Nathan and Oski's Hematology and oncology of infancy and childhood. Edit. Stuart H. Orkin, David E. Fisher, A Thomas Look, Samuel E Lux. Eighth Edition. P: 52-72.
11. Murillo ET, Gonzáles EM. Síndrome de bilis espesa simulando quiste de colédoco. *Rev Soc Bol Ped*.2010; 49:150-4.
12. Sáenz GF, Zuñiga LG, Brilla E, Chaves M, Montero AG, Jiménez J. Esferocitosis hereditaria y síndrome de bilis espeso. *Ac Med Cost*. 1982; 25(2): 97-103.
13. Osiniri Kippes. La ecografía clínica permite visualizar la causa de la ictericia patológica en lactantes y niños. *Pediatr Integral*. 2015; 19(3): 224-234.
14. Gubernick JA, Rosenberg HK, Ilaslan H, Kessler A. US approach to Jaundice in infants and childrens. *Radio-Graphis*.2000; 20:173-195.
15. Bollu BK, Dawrant MJ, Thacker K, Thomas G, Chenapragadda M, Gaskin K, et al. Inspissated bile syndrome; safe and effective minimally invasive treatment with percutaneous cholecystostomy in neonates and infants. *J Pediatr Surg*. 2016; 51(12): 2119-2122.
16. Berrani H, Vasies I, Cron J, Bachy B, Le Dosseur P, Mouterde O. Association of N-acetylcysteine and glucagon during percutaneous cholangiography in the treatment of inspissated bile syndrome. *Arch Pediatr*. 2015; 22(3): 300-302.
17. Ashish Jain, Ujjal Poddar, Priti Elhence, Archana Tripathi, Upendra Shava, et al. Cholestasis in a neonate with ABO hemolytic disease of newborn following transfusion of ABO group-specific red cells compatible with neonatal serum: inspissatedbili syndrome. *Blood Transfus*. 2014; 12: 621-623.