

پیش بینی خطر کم خونی در فرزندان ناقلین تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها

• دکتر حبیب اله گل افشان

دکترای علوم آزمایشگاهی، هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

golafshanh@sums.ac.ir

• دکتر ناهید نصیری

دکترای تخصصی هماتولوژی

می باشند. این گروه از بیماری ها شایع ترین اختلالات تک ژنی در دنیا بوده که مشکلات جدی سلامت را به بار می آورند. در حال حاضر پیوند سلول های مادر خون ساز تنها راه درمان کم خونی های شدید است و قبل از پیوند از درمان های حمایتی استفاده می شود. زندگی وابسته به تزریق خون نه تنها مشکلات فراوان برای بیمار در بر داشته، بلکه زندگی خانواده را نیز تحت تأثیر قرار می دهد. بهترین راه جلوگیری از تولد فرزند مبتلا به کم خونی شدید، شناسایی ناقلین در برهه زمانی سن بلوغ یا قبل از ازدواج و یا در حین بارداری و آموزش صحیح به ناقلین پرخطر کم خونی می باشد.

جدول زیر نامطلوب ترین حالت در فرزندان ناقلین پرخطر را نشان می دهد و این به مفهوم آن نیست که تمام فرزندان مبتلا خواهند شد بلکه در اکثر موارد بدترین حالتی که احتمالاً در ۲۵٪ فرزندان رخ می دهد را نشان می دهد. در جدول ناحیه سفید به مفهوم بدون خطر شناخته شده، رنگ قرمز بیانگر خطر جدی و کم خونی شدید، رنگ بنفش با خطر جدی کمتر یا کم خونی ملایم تر و رنگ زرد احتمال خطر نهفته را بیان می کند.

سندرم های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها از شایع ترین اختلالات تک ژنی در دنیا بوده که موجب کم خونی همولیتیک و زندگی وابسته به تزریق خون و مرگ و میر می گردند. شناسایی ناقلین در پیشگیری از تولد فرزندان پرخطر نقش مهمی در جامعه دارد. وضعیت فرزندان از نظر شدت کم خونی در ازدواج ناقلین در یک جدول رنگی با رنگ های سفید، قرمز، بنفش و زرد پیش بینی گردیده است. رنگ قرمز به مفهوم خطر جدی، رنگ بنفش با ریسک خطر کمتر، رنگ زرد به مفهوم خطر نهفته و رنگ سفید به مفهوم بدون خطر شناخته شده در فرزندان می باشد. در هر مورد توضیح تفصیلی ارائه می گردد.

کلمات کلیدی: تالاسمی، هموگلوبینوپاتی، ازدواج

ناقلین، جدول رنگی

خطر درجات مختلف کم خونی در فرزندان

ناقلین تالاسمی و هموگلوبینوپاتی

سندرم های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی ها گروهی گسترده از اختلالات ارثی در سنتز کمی و کیفی هموگلوبین

Carrier cell	α° Thai	α° Arab	α° Iran	α° Pakistan	α° India	Hb D	Hb D Arab	Hb D Pakistan	Hb D India	Hb D Iran	Hb D Pakistan	Hb D India	Hb D Iran
α° Thai													
α° Arab													
Hb D													
β° Thai													
β° Arab													
Hb D													
Hb D Arab													
Hb D													
Hb D Pakistan													
Hb D India													
Hb D Iran													
Not a carrier													

رنگ سفید علامت بدون ریسک خطر شناخته شده (Not known risk)
 رنگ قرمز با ریسک خطر جدی و کم خونی شدید (Possible serious risk)
 رنگ بنفش با ریسک خطر جدی کمتر (Less serious risk)
 رنگ زرد با احتمال ریسک خطر نهفته (Possible hidden risk)

چند مثال

هموزیگوت D ایران و پنجاب کم خونی نمی دهند.
مثال چهارم: چنانچه یکی از والدین ناقل تالاسمی α° ($\alpha\alpha/--$) و دیگری ناقل تالاسمی β° باشد، نقطه تلاقی ناحیه زرد با ریسک خطر نهفته است زیرا در این حالت امکان بیماری هموگلوبین اچ به علت حذف یک ژن آلفا در ناقل تالاسمی بتا وجود دارد. از طرف دیگر حذف سیس آلفا ممکن است در همراهی با ناقل β° با آنمی خفیف همراه باشد در حالی که حذف ترانس آلفا ($-\alpha/-\alpha$) با ناقل β° در ناحیه سفید قرار می گیرد. حذف سیس آلفا با ناقل β^+ نیز در ناحیه سفید قرار دارد.

از سالها پیش تا کنون فرمولهایی جهت افتراق آنمی فقر آهن از سندرمهای تالاسمی ماینور آلفا و بتا ابداع شده است که در جدول زیر مشاهده می نماید (۱). تمام این فرمولها جنبه آکادمیک داشته و بایستی با روشهای الکتروفورز تأیید گردند.

مثال اول: چنانچه یکی از والدین ناقل تالاسمی α° ($\alpha\alpha/--$) و دیگری هم ناقل تالاسمی α° ($\alpha\alpha/--$) باشد، در منطقه قرمز جدول تلاقی می کنند زیرا در این حالت احتمال تولد نوزاد مرده مبتلا به هیدروپس فتالیس با هموگلوبین بارت یا سقط در اوایل حاملگی به علت فقدان هر چهار ژن آلفا را به دنبال دارد.

مثال دوم: چنانچه یکی از والدین هتروزیگوت داسی و دیگری هتروزیگوت برای هموگلوبین D پنجاب یا لس آنجلس باشد باز هم در منطقه قرمز تلاقی می کنند زیرا هتروزیگوت ترکیبی داسی و D پنجاب شبیه آنمی داسی شکل است ولی منطقه تلاقی آن با D ایران در نقطه سفید یا بی خطر است.

مثال سوم: چنانچه هر دو والدین ناقل هموگلوبین D باشند نقطه تلاقی در منطقه سفید رنگ است زیرا

افتراق سندرم‌های تالاسمی ماینور آلفا و بتا از آنمی فقر آهن

Indices	Year	IDA	Thalassemia
Mentzer = MCV/RBC	1973	>13	<13
Srivastava = MCH/RBC	1973	>3.8	<3.8
England & Fraser = MCV- RBC- 5 × Hb - 3.4	1976	>0	<0
Ricerca = RDW/RBC	1987	>4.4	<4.4
Green & King = MCV ² × RDW/100 × Hb	1989	>65	<65
MH ratio(Technicon) = %micro / %hypo	1992	<1	>1
Sirdah = MCV- RBC - 3 × Hb	2008	>27	<27
MH ratio (Siemens)	2008	<3.4	>3.4
Ehsani = MCV- (10 × RBC)	2009	>15	<15
%MicroR - %Hypo He	2010	<11.5	>11.5
%MicroR - %Hypo He - RDW	2011	< -7.6	> -7.6

بنابراین وراثت $\beta+\beta+$ ممکن است با تالاسمی ایترمدیای خفیف یا شدید جلوه کند. موارد شدید جهش $\beta+$ شبیه β^0 بوده و حدود ۵ در صد ژن سالم فرآورده دارد. مواردی از $\beta^0\beta+$ خفیف ممکن است به صورت ایترمدیا درآید و مواردی از $\beta+\beta+$ ممکن است به صورت تالاسمی ماینور بتا جلوه کند. بنابراین جلوه بالینی بستگی به نوع جهش β دارد که با روش‌های مولکولی قابل تشخیص است.

نکته‌های مهم

۱- تالاسمی ماینور آلفا با ژنوتایپ‌های ترانس $(-\alpha/-\alpha)$ و سیس $(--\alpha\alpha)$ با آزمایش‌های CBC و اندازه‌گیری Hb A2 قابل افتراق نمی‌باشند و نیازمند آزمایش‌های مولکولی مانند Gap PCR برای تشخیص است. حذف سیس آلفا در همراهی با تالاسمی‌های آلفا عوارضی مانند بیماری هموگلوبین اچ و هیدروپس فتالیس با هموگلوبین‌بارت را به دنبال دارد.

۲- افزایش هموگلوبین A2 (بیشتر از ۳/۵٪) بدون توجه به اندکس‌های خون بیانگر تالاسمی ماینور بتاست. گرچه مواردی از قبیل پرکاری تیروئید، کم‌خونی مگالوبلاستیک، درمان HIV و هموگلوبین‌های ناپایدار ممکن است

چنانچه روش‌های الکتروفورز قانع‌کننده نباشد بایستی از روش‌های مولکولی مانند محاسبه نسبت سنتز زنجیره آلفا به بتا و یا از روش‌های مولکولی دیگر مانند Gap-PCR, Sequencing و MLPA, ARMS, ASO, RE-PCR برای تشخیص صحیح بهره‌گرفت.

PCR: Polymerase Chain Reaction

MLPA: Multiplex Ligation dependent Probe Amplification

RE: Restriction Enzyme

ASO: Allele Specific Oligonucleotide

ARMS: Amplification Refractory Mutation System

جهش‌های تالاسمی بتا ممکن است با فقدان فرآورده زنجیره بتا (β^0) یا موجب کاهش تولید زنجیره بتا ($\beta+$) گردند. از مثال‌های β^0 می‌توان به جهش در رمز اسید آمینه شماره 39 β^0 و IVS 1-1, IVS 2-1 اشاره کرد. جهش‌های $\beta+$ ممکن است مانند جهش IVS 1-110 بسیار شدید و یا مانند IVS 2-844, IVS 2-745, IVS 1-6 متوسط و یا خفیف (87-, -88) و یا خاموش (101-) باشند. در حامل خاموش اندکس‌ها و هموگلوبین A2 طبیعی است.

آزمایش بتکه که شیوه پخش هموگلوبین F را در گلبول‌ها نشان می‌دهد می‌توان این دو حالت را از هم افتراق داد. در تالاسمی دلتا بتا پخش غیر یکنواخت و در HPFH پخش یکنواخت مشاهده می‌شود.



پخش غیر یکنواخت هموگلوبین F در تالاسمی دلتا بتا

حذف ژن‌های خوشه بتا

۱- حذف تمام یا قسمتی از ژن بتا منجر به تالاسمی β^0 می‌گردد. برای مثال یک حذف 619 bp (جفت باز) در انتهای 3' ژن بتا شایع‌ترین آلل در جمعیت آسیایی هندی است. حذف‌های بزرگ که ناحیه پروموتور ژن بتا را در بر می‌گیرد با افزایش غیر معمول Hb A2 حتی در سطح ۹-۶ درصد در حالت هتروزیگوت مشاهده می‌گردد.

۲- تالاسمی β^{δ} که با افزایش ۵ تا ۲۵ درصدی هموگلوبین F در حالت هتروزیگوت و ۱۰۰ درصدی هموگلوبین F در حالت هموزیگوت همراه است.

۳- تالاسمی‌های حذفی $(\gamma\delta\beta)$ و $(\epsilon\gamma\delta\beta)$ که حتی در حالت هتروزیگوت با کم‌خونی شدید میکروسیت و هایپوکروم وابسته به تزریق خون در نوزادی همراه بوده و پس از ۳ تا ۶ ماه شبیه تالاسمی ماینور بتا در بزرگسالان و فاقد علائم بالینی می‌گردد.

۴- سندرم HPFH حذفی یا سندرم پا بر جایی سنتز هموگلوبین F که در حالت هتروزیگوت میزان هموگلوبین F بین ۳ تا ۳۵٪ متغیر است.

۵- حذف قسمتی از ژن‌های دلتا و بتا و ادغام آن‌ها در

Hb A2 را اندکی افزایش دهند ولی همیشه افزایش Hb A2 جدی است.

۳- کاهش اندکس‌های گلبول قرمز در تالاسمی ماینور آلفا، ماینور بتا و بیماری هموگلوبین E همراه با افزایش شمارش گلبول قرمز دیده می‌شود. در مناطقی که شیوع تالاسمی آلفا کم است از کاهش اندکس‌ها همراه با اریتروسیتوز می‌توان برای اسکرین تالاسمی ماینور بتا استفاده کرد.

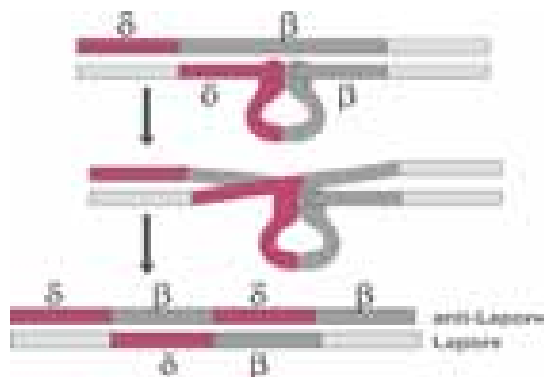
۴- همراهی وراثت تالاسمی ماینور بتا با تالاسمی آلفا $(-\alpha/\alpha)$ و یا بندرت $(-\alpha/-\alpha)$ ممکن است به علت بالانس بهتر زنجیره‌ها اندکس‌ها را نرمال کند و تشخیص تالاسمی ماینور بتا را مشکل نماید ولی افزایش هموگلوبین A2 این وراثت همزمانی را همراهی می‌کند.

۵- یکی از مشکلات تشخیصی تالاسمی ماینور بتا مقدار نرمال یا لب مرز هموگلوبین A2 و حتی گاهی با اندکس‌های طبیعی است (حامل خاموش). گرچه اکثر این موارد تشخیص داده نمی‌شوند و در همراهی با تالاسمی ماینور بتا ممکن است تالاسمی ایترمدیا را به دنبال داشته باشد. برخی از جهش‌ها از قبیل $-101 (C>T)$, $-92 (C>T)$ به صورت حامل خاموش ماینور بتا خود را نشان می‌دهند.

۶- گاهی با وجود اندکس‌های تالاسمیک مقدار Hb A2 نرمال یا حتی کمتر از نرمال است. برای مثال همراه شدن تالاسمی ماینور بتا با جهش‌های ژن دلتا به صورت سیس و ترانس می‌تواند موجب کاهش ۵۰ درصدی هموگلوبین A2 یا حتی مقدار A2 در حد صفر گردد. در این موارد آزمایش‌های مولکولی جهت افتراق از تالاسمی آلفا لازم است.

۷- دو گونه تالاسمی ماینور بتا با افزایش ۴ تا ۱۸ درصدی هموگلوبین F و سطح نرمال A2 همراه است. تالاسمی دلتا-بتا با حذف یا جهش ناکارآمد در دو ژن دلتا و بتا و بیان بیشتر ژن گاما که به آن تالاسمی F هم گفته می‌شود و دیگری HPFH حذفی است که به مفهوم تداوم سنتز هموگلوبین F است که هموگلوبین F بین ۳ تا ۳۰ درصد قرار می‌گیرد.

حذفی به مفهوم حذف شدن ژن‌های بتا و دلتا و فعال شدن بیشتر ژن گاما است. در تالاسمی دلتا-بتا اندکس‌ها تالاسمیک، ولی در HPFH نرمال یا در مرز نرمال است. با



شکل گیری هموگلوبین لپور در نتیجه تقاطع نابرابر
(Crossing Over) هاپلوتایپ های کروموزوم ۱۱

نتیجه تقاطع نابرابر که نتیجه آن سرعت کند سنتز زنجیره دلتا بتا بوده و هموگلوبین لپور ($\alpha_2(\delta\beta)_2$) نام دارد و در گروه سندرم‌های تالاسمی قرار می‌گیرد.

با توجه به جایگاه ادغام چهار نوع هموگلوبین لپور به نام‌های هلندیا، بوستون/ واشنگتن، بالتیمور و لیدن شناخته شده است. هموگلوبین لپور در حالت هتروزیگوت ۵ تا ۱۵٪ کل هموگلوبین بوده و در جایگاه S روی استات سلولز قرار می‌گیرد. با روش الکتروفورز IFE قابل افتراق بوده و در جایگاه ویژه بین هموگلوبین‌های A و S قرار می‌گیرد.

۶- حذف ژنتیکی و ادغام قسمتی از ژن‌های $\gamma\beta$ ، هموگلوبین کنیا را تشکیل داده که مانند HPFH عمل می‌کند.

Hematologic Features			
Genotypes	Heterozygotes	Homozygous State	DNA Analysis by PCR Methods
α^0 -Thalassemia Deletion (-)	0-2% Hb Bart's at birth, minimal hematology changes	0-10% Hb Bart's at birth, low MCH and MCV	Cap PCR: $\alpha\alpha 1$, $\alpha\alpha 2$ alleles
Nondeletion (+)	Variable in alleles, but hematology changes may be more severe	Hb H disease in some cases	Selective PCR of $\alpha 1$ or $\alpha 2$, then ASD, BE-PCR or sequencing
Nondeletion (+)	0-2% Hb Bart's at birth, 0.5-1% Hb Constant Spring	Slightly more severe than heterozygous α^0 -Thalassemia	Selective PCR of $\alpha 1$ or $\alpha 2$, then ASD, BE-PCR or sequencing
α^1 -Thalassemia (-)	0-10% Hb Bart's at birth, low MCH and MCV, minimal Hb A ₂	Hb Bart's hypochromic, 30% Hb Bart's, 20% Hb Portland at birth	Cap PCR: $\alpha\alpha 1$, $\alpha\alpha 2$, $\alpha\alpha 3$, $\alpha\alpha 4$, $\alpha\alpha 5$ alleles, MPA for all alleles
α^1 -Thalassemia (+) α^1 -Thalassemia		Hb H disease 20-40% Hb Bart's at birth, Hb hypochromic, stable with a low concentration of alleles	A ₂ allele
β^0 -Thalassemia	Low MCH and MCV Hb A ₂ 3.5-7.0%	Thalassemia major Hb F 90%, Hb A ₂ 2%	Nondeletion alleles as for β^0 -thal (Deletion alleles: Cap-PCR, MPA)
β^+ -Thalassemia Severe	Low MCH and MCV Hb A ₂ 4.5-7.0%	Thalassemia major; Hb F 20-80%	ASD, AMPL, sequencing
Mild	Low MCH and MCV Hb A ₂ 2.5-7.0%	Thalassemia intermedia; Hb F 20-60%	ASD, AMPL, sequencing
Mild	Normal MCH and MCV; Hb A ₂ 1.8-3.0%		ASD, AMPL, sequencing
Hb Lepore	Low MCH and MCV; Hb Lepore 0-20% low Hb A ₂	Thalassemia major/intermedia; Hb F 60%, Hb Lepore 20%	Cap-PCR, MPA
$\delta\beta$ -Thalassemia	Low MCH and MCV; normal Hb A ₂ Hb F 4-18% (heterozygous)	Thalassemia intermedia; 100% Hb F	Cap-PCR, MPA
HPFH			
Deletion	Normal index; Hb F 11-20% (genotype)	Normal; 100% Hb F	Cap-PCR, MPA
Nondeletion	Normal index; Hb F 1-20%	Not described	Sequencing, GeneScan-TIB or C-T

در جدول فوق الگوی الکتروفورز در حالت‌های هتروزیگوت و هموزیگوت سندرم‌های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی‌ها و نیز روش‌های مولکولی در تشخیص آن‌ها آورده شده است. سندرم‌های تالاسمی آلفا در دوران جنینی و بدو تولد با هموگلوبین بارت و پس از تولد با هموگلوبین اچ همراه می‌باشند. مقدار هموگلوبین بارت در بدو تولد بستگی به تعداد حذف‌های ژن آلفا دارد. برای مثال در فقدان سه ژن آلفا به ۲۰ تا ۴۰ درصد می‌رسد. هموگلوبین بارت پس از ۶ ماهگی ناپدید می‌شود (۲).

شناخته شده است. جهش موجب دناتورده شدن و به هم خوردن ساختمان آلفا هلیکس زنجیره گلوبین می‌گردد. برخی جهش‌ها موجب جدا شدن دایمرهای گلوبین و جدا شدن ساختار هیم و یا تولید پاکت هیدروفیل در اطراف حلقه هیم می‌گردد. جهش‌های ناپایدار بتا بیشتر از آلفا علایم دار می‌گردد. گلوبین‌های دناتورده شده ایجاد هایزنبادی و کم خونی همولیتیک با ژاندریس و بزرگی طحال و گاهی سیانوز می‌کنند. دفع ادراری قهوه ای رنگ حاکی از مشتقات دایپرول در بیماران است. همراهی ژن بتای ناپایدار با تالاسمی β^0 و β^+ ایجاد کم خونی شدید می‌کند. هموگلوبین‌های ناپایدار در حالت هتروزیگوت هم علایم‌دار هستند.

برخی از واریانت‌های ناپایدار β چنان ناپایدار هستند که به سرعت از بین رفته و تنها مطالعه DNA قادر به تشخیص آن‌ها می‌باشد. آزمایش‌های رسوب هموگلوبین در ایزوپروپانول ۱۷٪ و تست حرارتی از آزمایش‌های اسکرین تشخیص هموگلوبین‌های ناپایدار هستند. هموگلوبین‌های ناپایدار دارای میل ترکیبی کم یا زیاد یا نرمال برای اکسیژن هستند (۵). جهش ناپایدار در یک ژن آلفا با تولید ۵ تا ۲۰٪ هموگلوبین ناپایدار همراه است که علایم بالینی ندارد ولی جهش ناپایدار بتا با تولید ۲۰ تا ۴۰ درصد هموگلوبین ناپایدار علایم دار می‌شود.



مشاهده رسوب هموگلوبین در ایزوپروپانول ۱۷ درصد از آزمایش‌های تشخیصی برای هموگلوبین‌های ناپایدار می‌باشد

Hb Variant	Hb Variant Name
Hb E	Hb E Bart's disease
Hb I	Hb I Bart's disease
Hb K	Hb K Bart's disease
Hb L	Hb L Bart's disease
Hb M	Hb M Bart's disease
Hb N	Hb N Bart's disease
Hb O	Hb O Bart's disease
Hb P	Hb P Bart's disease
Hb Q	Hb Q Bart's disease
Hb R	Hb R Bart's disease
Hb S	Hb S Bart's disease
Hb T	Hb T Bart's disease
Hb V	Hb V Bart's disease
Hb W	Hb W Bart's disease
Hb X	Hb X Bart's disease
Hb Y	Hb Y Bart's disease
Hb Z	Hb Z Bart's disease
Hb [I]	Hb [I] Bart's disease
Hb [K]	Hb [K] Bart's disease
Hb [L]	Hb [L] Bart's disease
Hb [M]	Hb [M] Bart's disease
Hb [N]	Hb [N] Bart's disease
Hb [O]	Hb [O] Bart's disease
Hb [P]	Hb [P] Bart's disease
Hb [Q]	Hb [Q] Bart's disease
Hb [R]	Hb [R] Bart's disease
Hb [S]	Hb [S] Bart's disease
Hb [T]	Hb [T] Bart's disease
Hb [V]	Hb [V] Bart's disease
Hb [W]	Hb [W] Bart's disease
Hb [X]	Hb [X] Bart's disease
Hb [Y]	Hb [Y] Bart's disease
Hb [Z]	Hb [Z] Bart's disease

همراهی هتروزیگوت و هموزیگوت و هتروزیگوت دوبل تالاسمی و هموگلوبین E با ژنوتایپ‌های مختلف تالاسمی آلفا با بیماری‌های EF Bart disease و AE Bart disease همراه بوده که از نظر بالینی به صورت هموگلوبین H و یا سندرم‌های تالاسمی اینترمدیا بروز می‌کند (۲).

گاهی همراهی تالاسمی آلفا با هتروزیگوت E(AE) یا هموزیگوت E(EE) و یا β^0 علامت دار می‌شود که تحت عناوین بیماری AE Bart و Hb EF Bart از آن یاد می‌شود. بیماری AE bart disease بارت نتیجه وراثت هم زمانی ژنوتایپ $(\alpha\alpha)$ با هتروزیگوت E است که با Hb A⁺ Hb E(15-13%) و هموگلوبین‌بارت همراه است.

Type	Hb Variant	Clinical Manifestation
Stable	Hb F	Stable due to decreased reactivity
Unstable	Hb S	Causes sickle cell disease
Increased oxygen affinity	Hb E	Mild anemia possible
Decreased	Hb C	Polychromasia due to decreased oxygen transport
Altered properties	Hb M	Causes due to iron abnormalities
Decreased synthesis	Hb Lepore	Thalassemia

وراثت هموگلوبین‌های مختلف منجر به علائم بالینی گوناگونی از قبیل کم خونی همولیتیک، آنمی با ایجاد اجسام هایزن، پرخونی و سیانوز می‌گردد

هموگلوبین‌های ناپایدار

ابتلای پدر یا مادر به هموگلوبین ناپایدار موجب انتقال آن به فرزندان می‌شود. تاکنون ۳۰۰ نوع هموگلوبین ناپایدار



References

- 1- Angela N.Barrett: *Thalassemia screening and confirmation of carriers in parent, form best practice and research: clinical obstetric and gynecology 39 (2017) 27-40 Elsevier Ltd.*
- 2- John old; *Hemoglobinopathies and thalassemia, National hemoglobinopathy reference laboratory, molecular hematology chapter17 form Emery and Rimoin's principle and practice of medical genetics: 2013, page 1-44 Elsevier.*
- 3- *Hemoglobinopathies: current practice for screening confirmation and follow-up, CDC December, 2015.*
- 4- Debbie Man; *Hemoglobinopathy genetics user hand book, university college London hospitals, 2016.*
- 5-Henry; *Clinical diagnosis by laboratory method, 2017, Elsevier.*

