



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปรียบเทียบระดับเบต้าฮิวแมนคอร์ริโอนิกโกนาโด
โทรปีนอิสระและพลาสมาโปรตีนเอในกระแสเลือด
มารดาของทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิด
ฮีโมโกลบินบาร์ทและทารกปกติในช่วงกึ่งการตั้งครรภ์

โดย ผศ. พญ. เฟื่องลดา ทองประเสริฐ และคณะ

เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปรียบเทียบระดับเบต้าฮิวแมนคอรีโอนิคโกนาโดโทรปินอิสระและพลาสมาโปรตีนเอในกระแสเลือดมารดาของทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทและทารกปกติในช่วงกึ่งการตั้งครรภ์

คณะผู้วิจัย

1. ผศ. พญ. เฟื่องลดา ทองประเสริฐ
2. รศ. นพ. ชเนนทร์ วนาภิรักษ์
3. ศ. นพ. ธีระ ทองสง

สังกัด

หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก
ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
Abstract ภาษาไทย	1
Abstract ภาษาอังกฤษ	2
Executive summary	3
เนื้อหางานวิจัย	8
Output ที่ได้จากโครงการ	15
ภาคผนวก ก	16
ภาคผนวก ข	21

การเปรียบเทียบระดับเบต้าฮิวแมนคอริโอนิกโกนาโดโทรปินอิสระและพลาสมาโปรตีนเอ
ในกระแสเลือดมารดาของทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท
และทารกปกติในช่วงกึ่งการตั้งครรภ์

เฟื่องลดา ทองประเสริฐ*, ชเนนทร์ วนาภิรักษ์* และ อีระ ทองสง*

*หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับเบต้าฮิวแมนคอริโอนิกโกนาโดโทรปินอิสระและพลาสมาโปรตีนเอระหว่างทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทและทารกปกติในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทช่วงกึ่งการตั้งครรภ์ (18 – 22 สัปดาห์) ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

วิธีการศึกษา: สตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในทารกอายุครรภ์ 18 – 22 สัปดาห์ และมารับบริการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) ที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2553 จะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับเบต้าฮิวแมนคอริโอนิกโกนาโดโทรปินอิสระและพลาสมาโปรตีนเอ และเจาะเลือดสายสะดือทารกเพื่อตรวจหาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทด้วยวิธี hemoglobin typing

ผลการศึกษา: กลุ่มตัวอย่างจำนวน 145 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรคจำนวน 28 ราย และกลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคจำนวน 117 ราย ในสตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรคพบระดับความเข้มข้นของ free β -hCG สูงกว่ากลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.018$) แต่ระดับความเข้มข้นของ PAPP-A ในสตรีตั้งครรภ์ทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.184$) สตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรคจะมีค่ามัธยฐานของ free β -hCG เท่ากับ 1.38 MoM ในขณะที่สตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคจะมีค่ามัธยฐานของ free β -hCG เท่ากับ 0.88 MoM ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.020$)

สรุปผลการศึกษา: ระดับ free β -hCG ในสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในช่วงไตรมาสสอง มีค่าสูงกว่ากลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ระดับ PAPP-A ในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน

The Difference of Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) between Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses and Non-Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses

Tongprasert, F.^{1*}, Wanapirak, C.¹ Tongsong, T.¹

¹Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Abstract

Background: Maternal serum levels of free β -hCG and PAPP-A are correlated with placental volume and placentomegaly is usually found in pregnancies with fetal Hb Bart's disease. Therefore, we hypothesize that these serum markers may be higher in fetuses affected by hemoglobin (Hb) Bart's disease.

Objective: To evaluate the levels of maternal serum free β -hCG and PAPP-A in identifying fetuses with Hb Bart's disease among pregnancies at risk.

Materials and Methods: One hundred and forty eight pregnancies at risk for fetal Hb Bart's disease scheduled for cordocentesis at 18 to 22 weeks were recruited into the study. Maternal serum free β -hCG and PAPP-A concentrations were measured before cordocentesis, and the final fetal diagnosis of Hb Bart's disease was based on fetal Hb typing using high-performance liquid chromatography.

Results: Maternal serum concentration of free β -hCG was significantly higher in women with fetal Hb Bart's disease than those with unaffected fetuses ($P = 0.018$), whereas the concentrations of PAPP-A was not significantly different ($P = 0.184$). The median MoM of free β -hCG in the affected group was 1.38 MoM and in the unaffected group was 0.88 MoM ($P = 0.020$).

Conclusion: At midpregnancy, maternal serum free β -hCG in pregnancies with fetal Hb Bart's disease is significantly higher than in the unaffected pregnancies whereas PAPP-A level seems to be similar in both groups.

Keywords: hemoglobin Bart's disease, maternal serum marker, free β -human chorionic gonadotropin, pregnancy-associated plasma protein-A, alpha-fetoprotein

*Corresponding author.

Tel.: 0-5394-5552; Fax: 0-5394-6112

E-mail: fpunyath@med.cmu.ac.th

Executive Summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย (thalassemia) เป็นกลุ่มอาการโลหิตจางที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive ซึ่งพบมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย เกิดจากความผิดปกติในการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) โดยมีการผลิตสายโกลบิน (globin chain) ชนิดใดชนิดหนึ่ง (หรือมากกว่าหนึ่งชนิด) ลดน้อยลง เกิดความไม่สมดุลของการสังเคราะห์สายโกลบิน ทำให้เกิดการสร้างเม็ดเลือดแดงไม่มีประสิทธิภาพ เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย และเกิดภาวะโลหิตจางตามมา โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความรุนแรงแตกต่างกัน โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท (homozygous alpha thalassemia-1 หรือ hemoglobin Bart's disease) เป็นโรคโลหิตจางชนิดที่มีความรุนแรงมากที่สุด เนื่องจากทารกที่เป็นโรคจะแสดงอาการตั้งแต่ออยู่ในครรภ์ โดยจะมีอาการซีดจนเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว ทำให้แสดงอาการบวมหน้า (hydrops fetalis) และเสียชีวิตตามมายุติ ในปัจจุบันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทนี้ยังไม่มีวิธีรักษาให้หายขาด จึงก่อให้เกิดการตั้งครรภ์ที่สูญเสียไป นอกจากนั้นยังอาจทำให้เกิดอันตรายต่อมารดาที่ตั้งครรภ์ได้ด้วยหลายประการ เช่น ภาวะครรภ์เป็นพิษ การคลอดติดขัด และตกเลือดหลังคลอด ดังนั้นการวินิจฉัยก่อนทารกคลอดจึงมีความสำคัญในการลดอัตราพหุผลภาวะและอัตราตายของสตรีตั้งครรภ์เอง และการวินิจฉัยให้ได้ตั้งแต่อายุครรภ์น้อยๆ ยังมีผลดีต่อจิตใจมารดาในเรื่องความสูญเสีย ในกรณีที่ทารกเป็นโรคและต้องยุติการตั้งครรภ์อีกด้วย

สืบเนื่องจากพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท เกิดจากทารกในครรภ์ไม่สามารถสร้างเม็ดเลือดแดงที่ปกติได้ ทำให้มีภาวะซีดจนเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว เกิดอาการบวมหน้า และมีภาวะรบกวนตัวผิดปกติตามมา ทำให้การสร้างสารชีวเคมีบางชนิดจากรกมีการเปลี่ยนแปลงและถูกแลกเปลี่ยนเข้าสู่กระแสเลือดมารดาในระดับที่ผิดปกติไปจากการตั้งครรภ์ปกติ ดังนั้นการตรวจเลือดมารดาเพื่อวัดระดับสารชีวเคมีบางชนิดที่สร้างจากรกจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาทารกที่มีโอกาสเสี่ยงต่อโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้โดยไม่ต้องอาศัยบุคลากรที่เชี่ยวชาญเฉพาะทาง หรือเทคโนโลยีที่ยุ่งยากซับซ้อน

Free beta human chorionic gonadotropin (hCG) และ pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) เป็นสารชีวเคมีที่สร้างจากรกและถูกนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาทารกกลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) ในการตั้งครรภ์ไตรมาสแรกอย่างแพร่หลาย มีการศึกษาพบว่าในทารกที่มีภาวะบวมหน้าจะพบการเปลี่ยนแปลงของระดับ free beta hCG และ PAPP-A ในกระแสเลือดมารดา(1-3) และเคยมีการศึกษาพบว่าระดับ free beta hCG ในกระแสเลือดมารดาของทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทจะมีระดับสูงกว่าทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(4, 5) โดยพบว่าระดับ free beta hCG ในทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในการตั้งครรภ์ปลายไตรมาสแรกมีค่าสูงกว่าทารกปกติ แต่ยังคงมีความเหลื่อมล้ำกันอยู่มาก ในขณะที่ระดับ free beta hCG ในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่สอง (15 – 23 สัปดาห์) พบความแตกต่างดังกล่าวมากขึ้น แต่เนื่องจากการศึกษาดังกล่าวมีจำนวนกลุ่มตัวอย่างคือทารกที่เป็นโรคจำนวนไม่มากนัก (18 ราย สำหรับ 9 สัปดาห์อายุครรภ์) และระดับ free beta hCG มีความแปรปรวนไปตามอายุครรภ์ ทำให้ข้อมูลที่มีอยู่ไม่สามารถสรุปและนำมาใช้ในทางคลินิกได้ อย่างไรก็ตามจากหลักฐานดังกล่าวทำให้เชื่อว่าระดับ free beta hCG ในการตั้งครรภ์ไตรมาสแรกอาจยังไม่สามารถนำมาใช้แยกทารกปกติออกจากทารกที่เป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้อย่างชัดเจน แต่ในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่สองซึ่งเป็นช่วงเวลาที่รกของทารกที่เป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทแสดงอาการบวมหน้า

ระดับ free beta hCG น่าจะแตกต่างจากทารกปกติชัดเจนขึ้น สำหรับ PAPP-A มีการศึกษาน้อยในรายที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ซึ่งพบว่าในการตั้งครรภ์ไตรมาสแรกมีระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่มีแนวโน้มที่จะแตกต่างกันเมื่ออายุครรภ์มากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าระดับของ PAPP-A อาจช่วยแยกทารกทั้งสองกลุ่มได้ดีในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่สอง และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารชีวเคมีที่นำมาใช้ในการวินิจฉัยทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในระยะก่อนคลอด

โดยสรุปจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าระดับ free beta hCG และ PAPP-A ในกระแสเลือดมารดาในช่วงปลายไตรมาสแรก อาจช่วยแยกทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทออกจากทารกปกติได้แต่ประสิทธิภาพยังไม่ดีนัก และมีข้อมูลบ่งชี้ว่าในช่วงอายุครรภ์ที่มากขึ้นจะพบความแตกต่างของระดับสารชีวเคมีดังกล่าวชัดเจนมากขึ้น และมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำมาใช้ในการแยกทารกทั้งสองกลุ่มได้ดี ผู้วิจัยจึงดำริที่จะทำการศึกษาเปรียบเทียบระดับของ free beta hCG และ PAPP-A ระหว่างทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทและทารกปกติในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในช่วงอายุครรภ์ 18 – 22 สัปดาห์ ว่าจะสามารถนำมาใช้จำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคออกจากทารกปกติได้หรือไม่ ข้อมูลที่ได้รับคาดว่าจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทของทารกในครรภ์ด้วยเทคนิควิธีที่ง่ายขึ้น รวมทั้งสามารถลดการทำหัตถการชนิดรูก้ำซึ่งมีความเสี่ยงต่อการแท้งบุตรและอาจมีอันตรายต่อมารดา นำไปสู่การพัฒนาเทคนิคการตรวจคัดกรองโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทของทารกในครรภ์ในประเทศไทย เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียของประเทศต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเปรียบเทียบระดับ free beta hCG และ PAPP-A ระหว่างทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทและทารกปกติในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทช่วงกึ่งการตั้งครรภ์ (18 – 22 สัปดาห์) ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่
2. ในกรณีที่พบความแตกต่างของระดับ free beta hCG และ PAPP-A อย่างมีนัยสำคัญ จะศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำนายทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในช่วงกึ่งการตั้งครรภ์ (18 – 22 สัปดาห์)

3. ระเบียบวิธีวิจัย

รูปแบบการวิจัย : Cross sectional analytical study

ประชากร : สตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในทารก อายุครรภ์ 18 – 22 สัปดาห์ และมารับบริการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) ที่โรงพยาบาลมหาราชานครเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนมีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2553 ประมาณ 200 ราย

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง (Inclusion criteria)

1. สตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในทารก และตัดสินใจรับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis)

2. อายุครรภ์อยู่ในช่วง 18 – 22 สัปดาห์
3. จำวันแรกของประจำเดือนครั้งสุดท้ายได้แน่นอน และมีประวัติประจำเดือนสม่ำเสมอ หรือเคยได้รับการตรวจยืนยันอายุครรภ์ที่ถูกต้องด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงในช่วงครึ่งแรกของการตั้งครรภ์มาก่อน
4. เป็นการตั้งครรภ์เดี่ยว

เกณฑ์การคัดออกจากกลุ่มตัวอย่าง (Exclusion criteria)

1. ทารกมีความพิการโดยกำเนิด ยกเว้นอาการบวมหน้าที่เกิดจากโรคธาลัสซีเมีย
2. ทารกมีภาวะโครโมโซมผิดปกติ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกสตรีที่ตั้งครรภ์อายุครรภ์ 18 – 22 สัปดาห์ที่มารับบริการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือทารกที่หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเข้าเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าสู่โครงการวิจัย ในระหว่างวันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2552 ถึง 31 ตุลาคม พ.ศ. 2553
2. สตรีตั้งครรภ์ที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างจะได้รับการอธิบายถึงการวิจัยโดยละเอียดถึงวัตถุประสงค์ วิธีการ รวมทั้งข้อดีข้อเสีย พร้อมทั้งลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย
3. บันทึกข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะทางประชากรศาสตร์ และสูติศาสตร์ทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย ได้แก่ อายุ อายุครรภ์ (วันแรกของประจำเดือนครั้งสุดท้าย และ/หรือข้อมูลการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง) เชื้อชาติ น้ำหนักตัว ประวัติโรคประจำตัว เช่น เบาหวานชนิด IDDM และประวัติการคลอดทารกที่มีโครโมโซมผิดปกติ เป็นต้น
4. เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 5 ซีซี เพื่อทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวัดระดับ free beta hCG และ PAPP-A และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกข้อมูล

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี ELIZA โดยเครื่องตรวจ fully automated immunoassay ELISA system (บริษัท PerkinElmer's)

- การตรวจหาระดับ free beta hCG ในกระแสเลือดมารดา ใช้ DELFIA® Xpress free beta hCG kits (บริษัท PerkinElmer's) ซึ่งเป็นการตรวจวัดเชิงปริมาณของ free beta hCG subunits โดยใช้เทคนิค solid-phase, two-site fluoroimmunoassays ตามหลักการของ direct sandwich technique ซึ่งใช้ monoclonal antibodies 2 ชนิด จับโดยตรงต่อ antigenic determinants คนละที่กัน ซึ่งอยู่บนโมเลกุลของ free beta hCG เป็นวิธีการที่มีความไวมากกว่า 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- การตรวจหาระดับ PAPP-A ในกระแสเลือดมารดา ใช้ DELFIA® Xpress PAPP-A kits (บริษัท PerkinElmer's) ซึ่งเป็นการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยใช้เทคนิค solid-phase, two-site fluoroimmunoassays ตามหลักการของ indirect sandwich technique ซึ่งใช้ monoclonal antibodies 2 ชนิด จับโดยตรงต่อ antigenic determinants คนละที่กัน ซึ่งอยู่บน PAPP-A/proMBP complex เป็นวิธีการที่มีความไวมากกว่า 10 มิลลิลินิต/ลิตร

5. ทำการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดเพื่อวินิจฉัยโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียฮีโมโกลบินบาร์ทในทารกด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) ตามวิธีมาตรฐาน นำเลือดส่งตรวจ hemoglobin typing ของทารก ด้วยวิธี HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)
6. ตรวจสอบติดตามการฝากครรภ์ตามปกติ และจัดบันทึกผลลัพธ์ของการตั้งครรภ์ในแบบบันทึกข้อมูล
7. นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติ

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล (Methods of data analysis)

1. ข้อมูลประชากรศาสตร์และสถิติศาสตร์ทั่วไป แจกแจงคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
2. หาความแตกต่างของระดับ free beta hCG และ PAPP-A ของทารกในครรภ์ในกลุ่มทารกที่เป็นและไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท โดยใช้ T test
3. หาค่าความไว ความจำเพาะ และค่าจุดตัด (cut off) ของระดับ free beta hCG และ PAPP-A เพื่อใช้จำแนกทารกที่เป็น homozygous alpha thalassemia-1 ออกจากทารกที่ไม่เป็นโรค โดยใช้ตาราง 2 x 2 และ ROC curve

4. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการในแต่ละช่วง 6 เดือน

เดือนที่ 1-6

- เตรียมแบบบันทึกข้อมูล อุปกรณ์นำยาสารเคมีและทดสอบการตรวจทางห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐาน
- เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์หาระดับ free beta hCG และ PAPP-A และทำการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) เพื่อตรวจ hemoglobin typing ด้วยวิธี HPLC

เดือนที่ 7-12

- เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์หาระดับ free beta hCG และ PAPP-A และทำการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) เพื่อตรวจ hemoglobin typing ด้วยวิธี HPLC

เดือนที่ 13-18

- เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์หาระดับ free beta hCG และ PAPP-A และทำการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) เพื่อตรวจ hemoglobin typing ด้วยวิธี HPLC

เดือนที่ 19-24

1. เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์หาระดับ free beta hCG และ PAPP-A และทำการเจาะเลือดสายสะดือทารก (cordocentesis) เพื่อตรวจ hemoglobin typing ด้วยวิธี HPLC
2. วิเคราะห์ข้อมูล เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ และตีพิมพ์ผลงานวิจัย

5. ผลงาน / หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: The difference of maternal serum markers between homozygous alpha thalassemia-1 fetuses and non homozygous alpha thalassemia-1 fetuses at 18 – 22 weeks of gestation หรือ

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์:

Maternal serum free beta human chorionic gonadotropin as a predictor of Hb Bart's disease at midpregnancy หรือ

Pregnancy-associated plasma protein-A in maternal blood as a predictor of Hb Bart's disease at midpregnancy

Obstetrics and Gynecology หรือ

Prenatal diagnosis หรือ

International Journal of Gynecology and Obstetrics

เนื้อหาของวิจัย

1. ผลการวิจัย

สตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในทารก อายุครรภ์ 18 – 22 สัปดาห์ที่มาใช้บริการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือทารกที่หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และเข้าเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าสู่โครงการวิจัย ในระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2554 มีจำนวนทั้งสิ้น 148 ราย ผลการตรวจ hemoglobin typing จากเลือดสายสะดือทารกด้วยวิธี HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจ Hemoglobin typing จากเลือดสายสะดือทารกของสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในทารก จำนวนทั้งสิ้น 148 ราย

ผลการตรวจ hemoglobin typing	จำนวนราย	ร้อยละ
● Homozygous α -thalassemia-1 disease	28	18.9
● α -thalassemia-1 carriers and normal hemoglobin typing	117	79.1
● Hemoglobin H / Constant spring disease	3	2.0
รวม	148	100.0

สตรีตั้งครรภ์ที่ผลการตรวจเลือดสายสะดือทารกเป็น hemoglobin H / Constant spring disease ทั้ง 3 ราย ถูกคัดออกจากการศึกษา เนื่องจากเป็นโรคที่อาจทำให้เกิดภาวะบวมน้ำได้เช่นเดียวกับ homozygous α -thalassemia-1 disease ดังนั้นจึงเหลือกลุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จำนวนทั้งสิ้น 145 ราย แบ่งเป็นกลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรคจำนวน 28 ราย และกลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคจำนวน 117 ราย ลักษณะข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของทั้งสองกลุ่มได้แก่ อายุและน้ำหนักสตรีตั้งครรภ์ และอายุครรภ์ที่เจาะเลือดสายสะดือทารก ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะข้อมูลพื้นฐานของสตรีตั้งครรภ์โดยเปรียบเทียบกลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease และกลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรค

	กลุ่มเป็นโรค	กลุ่มไม่เป็นโรค	P-value
อายุสตรีตั้งครรภ์ (ปี)			
● ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	29.58 \pm 6.68	27.82 \pm 6.01	0.19
	17 – 41	16 – 45	

<ul style="list-style-type: none"> • พิสัย 			
อายุครรภ์ที่เจาะเลือดสายสะดือ (สัปดาห์) <ul style="list-style-type: none"> • ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน • พิสัย 	18.43 ± 0.96 17 – 20	18.66 ± 0.91 17 – 21	0.24
น้ำหนักสตรีตั้งครรภ์ (กิโลกรัม) <ul style="list-style-type: none"> • ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน • พิสัย 	57.76 ± 11.73 39.1 – 97.5	56.73 ± 9.49 38.2 – 101.1	0.63

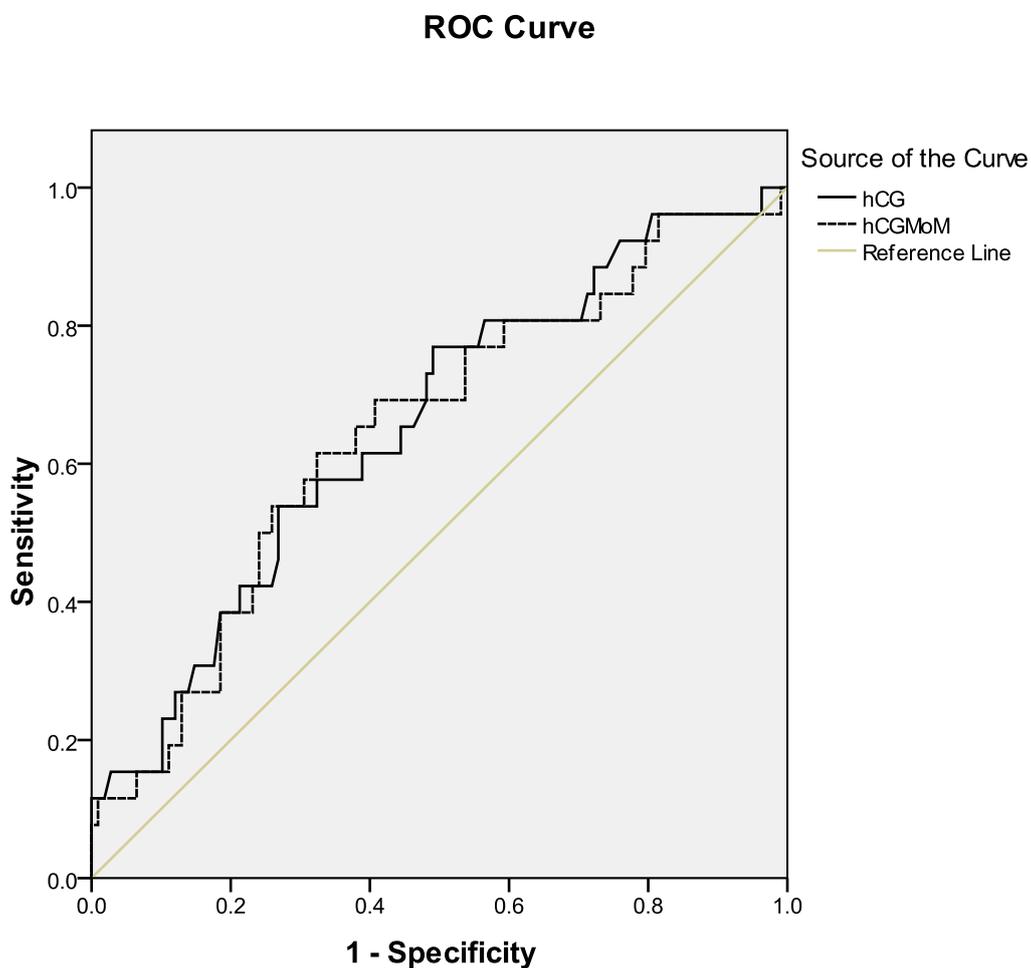
เมื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของ free β -hCG และ PAPP-A ในสตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นและไม่เป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease โดยใช้ Mann-Whitney U test (เนื่องจากข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติ) พบว่าระดับความเข้มข้นของ free β -hCG ในสตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรคมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับความเข้มข้นของ PAPP-A ในสตรีตั้งครรภ์ทั้งสองกลุ่มกลับไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้เมื่อนำระดับความเข้มข้นของ free β -hCG ของสตรีตั้งครรภ์แต่ละรายมาเปรียบเทียบกับค่ามัธยฐานของ free β -hCG ของสตรีตั้งครรภ์ปกติในแต่ละอายุครรภ์เพื่อคำนวณหาค่า multiple of median (MoM) แล้วนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างของ free β -hCG (MoM) ในสตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นและไม่เป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease พบว่าสตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรคจะมีค่ามัธยฐานของ free β -hCG เท่ากับ 1.38 MoM ในขณะที่สตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคจะมีค่ามัธยฐานของ free β -hCG เท่ากับ 0.88 MoM ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.020$)

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเข้มข้นของ free β -hCG และ PAPP-A ในสตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์เป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease และกลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรค

	กลุ่มเป็นโรค	กลุ่มไม่เป็นโรค	P-value
ระดับความเข้มข้น free β -hCG (ng/mL)			
<ul style="list-style-type: none"> • ค่ามัธยฐาน • พิสัย 	12.3 1.8-66.8	8.4 1.0-37.4	0.018
ระดับความเข้มข้น PAPP-A (mU/L)			
<ul style="list-style-type: none"> • ค่ามัธยฐาน • พิสัย 	15169.2 4329.3-27313.9	13540.9 3478.6-29821.5	0.184

เมื่อนำระดับความเข้มข้นของ free β -hCG และค่า free β -hCG (MoM) ในสตรีตั้งครรภ์มาทำนายโอกาสที่ทารกในครรภ์จะเป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease โดยใช้ receiving operating characteristic (ROC) curves จะพบว่าพื้นที่ใต้กราฟของระดับความเข้มข้นของ free β -hCG มีค่าเท่ากับ 0.655 (ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% เท่ากับ 0.539 - 0.771) และพื้นที่ใต้กราฟของค่า free β -hCG (MoM) มีค่าเท่ากับ 0.647 (ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% เท่ากับ 0.528 - 0.767) ดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดง ROC curves ของระดับความเข้มข้นของ free β -hCG และค่า free β -hCG (MoM) ในการทำนายโอกาสที่ทารกในครรภ์จะเป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease



Test Result Variable(s)	Area	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
hCG	0.655	0.014	0.539	0.771
hCG (MoM)	0.647	0.020	0.528	0.767

เมื่อคำนวณหาประสิทธิภาพของการทดสอบด้วยค่า free β -hCG (MoM) ที่จุดตัดต่างๆ กัน เพื่อจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease ออกจากทารกที่ไม่เป็นโรค ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของการทดสอบด้วยค่า free β -hCG (MoM) ที่จุดตัดต่างๆ กัน เพื่อจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรค homozygous α -thalassemia-1 disease ออกจากทารกที่ไม่เป็นโรค

	≥ 1.1 MoM	≥ 1.2 MoM	≥ 1.3 MoM	≥ 1.4 MoM	≥ 1.5 MoM
ความไว	57.1	50.0	50.0	46.4	35.7
ความจำเพาะ	68.4	73.5	75.2	76.9	81.2
ค่าทำนายผลบวก	30.2	31.1	32.6	32.5	31.3
ค่าทำนายผลลบ	87.0	86.0	86.3	85.7	84.1
Odd ratio	2.9	2.7	3.0	2.9	2.4
Accuracy rate	66.2	68.9	70.3	71.0	72.4
False positive rate	31.6	26.5	24.8	23.1	18.8

2. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

โรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท (homozygous α -thalassemia-1 หรือ hemoglobin Bart's disease) เป็นโรคโลหิตจางชนิดที่มีความรุนแรง เกิดจากทารกในครรภ์ไม่สามารถสร้างเม็ดเลือดแดงที่ปกติได้ ทำให้ทารกที่เป็นโรคมีอาการซีดจนเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว ทำให้แสดงอาการหัวใจโต (cardiomegaly) รกหนา (placentomegaly) ตับโต (hepatomegaly) บวมน้ำ (hydrops fetalis) และเสียชีวิตตามมาทุกราย สืบเนื่องจากพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ทำให้เกิดภาวะรกหนาตัวผิดปกติตามมา ทำให้การสร้างสารชีวเคมีบางชนิดจากรกมีการเปลี่ยนแปลงและถูกแลกเปลี่ยนเข้าสู่กระแสเลือดมารดาในระดับที่ผิดปกติไปจากการตั้งครรภ์ปกติ ดังนั้นการตรวจเลือดมารดาเพื่อวัดระดับสารชีวเคมีบางชนิดที่สร้างจากรกจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาทารกที่มีโอกาสเสี่ยงต่อโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้โดยไม่ต้องอาศัยบุคลากรที่เกี่ยวข้องเฉพาะทาง หรือเทคโนโลยีที่ยุ่งยากซับซ้อน

Free beta human chorionic gonadotropin (hCG) และ pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) เป็นสารชีวเคมีที่สร้างจากรกและถูกนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาทารกกลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) ในการตั้งครรภ์ไตรมาสแรกอย่างแพร่หลาย มีการศึกษาพบว่าในทารกที่มีภาวะบวมน้ำจะพบการเปลี่ยนแปลงของระดับ free β -hCG และ PAPP-A ในกระแสเลือดมารดา(1-3) จากการศึกษาในไตรมาสแรกพบว่าระดับ free β -hCG ในกระแสเลือดมารดาของทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทจะมีระดับสูงกว่าทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(4, 5) แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้แยกทารกปกติออกจากทารกที่เป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้อย่างชัดเจน แต่ในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่สองซึ่งเป็นช่วงเวลาที่รกของทารกที่เป็นโรคโลหิต

จากชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทแสดงอาการบวม น้ำ ระดับ free β -hCG น่าจะแตกต่างจากทารกปกติชัดเจนขึ้น โดยจากการศึกษาในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่สอง (15 – 23 สัปดาห์) พบความแตกต่างของระดับ free β -hCG ของทั้งสองกลุ่มมากขึ้น แต่เนื่องจากขนาดกลุ่มตัวอย่างในการศึกษาดังกล่าวมีจำนวนไม่มากนัก (18 ราย สำหรับ 9 สัปดาห์อายุครรภ์) และระดับ free β -hCG มีความแปรปรวนไปตามอายุครรภ์ ทำให้ข้อมูลที่มีอยู่ไม่สามารถสรุปและนำมาใช้ในทางคลินิกได้ สำหรับ PAPP-A มีการศึกษาน้อยในรายที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ซึ่งพบว่าในการตั้งครรภ์ไตรมาสแรกมีระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่มีแนวโน้มที่จะแตกต่างกันเมื่ออายุครรภ์มากขึ้น ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าระดับของ PAPP-A อาจช่วยแยกทารกทั้งสองกลุ่มได้ดีในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่สอง และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารชีวเคมีที่นำมาใช้ในการวินิจฉัยทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในระยะก่อนคลอด การศึกษานี้จึงต้องการเปรียบเทียบระดับของ free β -hCG และ PAPP-A ในทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทและทารกปกติในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในช่วงการตั้งครรภ์ไตรมาสสอง ว่าจะสามารถนำมาใช้จำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคออกจากทารกปกติได้หรือไม่

การศึกษาวิจัยนี้มีจำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งสิ้น 145 ราย โดยแบ่งเป็นกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกไม่เป็นโรค โลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทจำนวน 117 ราย และกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคจำนวนมากถึง 28 ราย ซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่มากกว่าการศึกษาที่ผ่านมา และเพียงพอที่จะนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มก็ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในตัวแปรที่สำคัญได้แก่อายุครรภ์ตั้งครรภ์ น้ำหนักสตรีตั้งครรภ์ และอายุครรภ์ที่เจาะเลือดสายสะดือทารก

จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าระดับความเข้มข้นของ free β -hCG ในกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในการตั้งครรภ์ช่วง 18 – 22 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.018$) นอกจากนี้หากนำระดับ free beta hCG มาเปรียบเทียบกับค่ามัธยฐานของคนปกติในแต่ละอายุครรภ์ (multiple of median; MoM) จะพบว่าค่ามัธยฐานของ free β -hCG ในกลุ่มที่เป็นโรคมีค่าเท่ากับ 1.38 MoM ในขณะที่สตรีตั้งครรภ์กลุ่มที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคจะมีค่ามัธยฐานของ free β -hCG เท่ากับ 0.88 MoM ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.020$) เช่นเดียวกัน ซึ่งผลการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับการศึกษาของ Ong และคณะ ในสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในการตั้งครรภ์ช่วง 11 – 14 สัปดาห์ จำนวน 22 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 436 ราย พบว่าค่า free β -hCG ในกลุ่มที่เป็นโรคมีค่าเท่ากับ 1.41 MoM ในขณะที่กลุ่มที่ไม่เป็นโรคมีค่าเท่ากับ 0.92 MoM(4) และในการศึกษาของ Tseng และคณะในการตั้งครรภ์ช่วง 14 – 23 สัปดาห์พบว่าค่า free β -hCG ในสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทจำนวนร้อยละ 78 (14 ใน 18 ราย) จะมีค่าสูงมากกว่า 2.5 MoM(5) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิจัยนี้พบเพียงร้อยละ 15 (4 ใน 26 ราย) ของสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทที่มีค่า free β -hCG สูงมากกว่า 2.5 MoM และพบร้อยละ 38 (10 ใน 26 ราย) ของสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทที่มีค่า free β -hCG สูงมากกว่า 1.5 MoM

เมื่อนำค่า free β -hCG (MoM) มาคำนวณเพื่อหาประสิทธิภาพในการจำแนกการตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทโดยใช้ค่าจุดตัดของ free β -hCG (MoM) ต่างๆ กันพบว่า หากใช้ค่าจุดตัดของ free β -hCG ที่มากกว่า 1.5 MoM ค่าความจำเพาะของการทดสอบจะสูงถึงร้อยละ 81.2 และอัตราผลบวกคลวงลงเท่ากับร้อยละ 18.8 แต่ค่าความไวของการทดสอบจะเท่ากับร้อยละ 35.7 แต่หากใช้ค่าจุดตัดของ free β -hCG ที่มากกว่า 1.1

MoM ค่าความไวของการทดสอบจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 57.1 แต่ค่าความจำเพาะจะลดลงเท่ากับร้อยละ 68.4 และมีอัตราผลบวกสูงถึงร้อยละ 31.6 ซึ่งยังถือว่าประสิทธิภาพของการทดสอบยังไม่ดีพอ ดังนั้นการใช้ free β -hCG เพียงอย่างเดียวเพื่อทำนายการตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทจากการศึกษาวิจัยนี้ยังไม่สามารถนำมาใช้ได้ในทางปฏิบัติ

อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ยังกระทบถึงการใช้ free β -hCG ในการตรวจคัดกรองเพื่อค้นหาทารกกลุ่มอาการดาวน์ เนื่องจากการตรวจคัดกรองทารกกลุ่มอาการดาวน์ในสตรีตั้งครรภ์ทั้งในไตรมาสแรกและไตรมาสสองนั้นประกอบด้วยการตรวจระดับ free beta hCG ร่วมกับสารชีวเคมีตัวอื่น โดยจะพบว่าระดับ free β -hCG ในสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นกลุ่มอาการดาวน์จะมีค่าสูงกว่าสตรีตั้งครรภ์ทารกปกติ โดยค่ามัธยฐานของ hCG ในมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกกลุ่มอาการดาวน์จะมีค่าประมาณ 2.22 MoM(6) ดังนั้นหากเจาะเลือดคัดกรองในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ระดับ free β -hCG อาจสูงผิดปกติได้ในรายที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ทำให้ค่าความเสี่ยงเพิ่มขึ้น และอาจแปลผลการตรวจคัดกรองกลุ่มอาการดาวน์ว่าอยู่ในกลุ่มความเสี่ยงสูงผิดปกติได้ ทำให้ต้องส่งตรวจโครโมโซมทารกในครรภ์ร่วมด้วยหากต้องตรวจวินิจฉัยก่อนคลอด และในแง่ของการศึกษาวิจัยในการคัดกรองคัดกรองเพื่อค้นหาทารกกลุ่มอาการดาวน์อาจต้องคัดกรองตัวอย่างที่ตั้งครรภ์ทารกโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทออกจากการศึกษา เนื่องจากจะเป็นตัวกวนสำคัญที่ทำให้การแปลผลค่าความเสี่ยงคาดเคลื่อนได้

จากการศึกษาวิจัยนี้พบว่าระดับ PAPP-A ในกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ในการตั้งครรภ์ช่วง 18 – 22 สัปดาห์ มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.184$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ong และคณะ ซึ่งไม่พบความแตกต่างของระดับ PAPP-A ในกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคกับกลุ่มควบคุมในช่วงอายุครรภ์ 11 – 14 สัปดาห์(4) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่สามารถนำ PAPP-A มาใช้เพื่อทำนายการตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้

โดยสรุปจากการศึกษาวิจัยพบว่าระดับ free β -hCG ในสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกเป็นโรคโลหิตจางชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในช่วงไตรมาสสอง มีค่าสูงกว่ากลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ทารกไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถใช้แยกทารกที่เป็นโรคออกจากทารกปกติได้แต่ประสิทธิภาพยังไม่ดีพอที่จะนำมาใช้ได้ทางปฏิบัติ นอกจากนี้ยังต้องระมัดระวังในการใช้ free β -hCG ในการตรวจคัดกรองทารกกลุ่มอาการดาวน์ในสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการมีลูกเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท เนื่องจากอาจทำให้การแปลผลคาดเคลื่อนไปได้

3. เอกสารอ้างอิง

1. Benn PA, Egan JF, Ingardia CJ. Extreme second-trimester serum analyte values in down syndrome pregnancies with hydrops fetalis. J Matern Fetal Neonatal Med 2002;11:262-5.
2. Saller DN, Jr., Canick JA, Oyer CE. The detection of non-immune hydrops through second-trimester maternal serum screening. Prenatal diagnosis 1996;16:431-5.
3. Saller DN, Jr., Canick JA, Schwartz S, Blitzer MG. Multiple-marker screening in pregnancies with hydropic and nonhydropic Turner syndrome. American journal of obstetrics and gynecology 1992;167:1021-4.

4. Ong CY, Lee CP, Leung KY, Lau E, Tang MH. Human chorionic gonadotropin and plasma protein-A in alpha⁰-thalassemia pregnancies. *Obstetrics and gynecology* 2006;108:651-5.
5. Tseng LH, Hwa HL, Chuang SM, Lee TY, Ko TM. Increased level of second trimester maternal serum chorionic gonadotropin in pregnancy with a fetus affected by homozygous alpha-thalassemia 1. *Archives of gynecology and obstetrics* 1994;255:113-7.
6. Wald N, Densem J, Stone R, Cheng R. The use of free beta-hCG in antenatal screening for Down's syndrome. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1993;100:550-7.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Tongprasert F, Wanapirak C, Tongsong T. Maternal serum hCG, PAPP-A and AFP as predictors of hemoglobin Bart disease at mid-pregnancy. Prenat Diagn 2011;31:430-3.
2. Tongprasert F, Wanapirak C, Tongsong T. The Difference of Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) between Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses and Non-Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses. (In preparation for submission in Prenatal Diagnosis)

ภาคผนวก ก

1. Tongprasert F, Wanapirak C, Tongsong T. Maternal serum hCG, PAPP-A and AFP as predictors of hemoglobin Bart disease at mid-pregnancy. Prenat Diagn 2011;31:430-3.

Maternal serum hCG, PAPP-A and AFP as predictors of hemoglobin Bart disease at mid-pregnancy

Fuanglada Tongprasert, Chanane Wanapirak and Theera Tongsong*

Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Objective To evaluate the ability of maternal serum-free β -human chorionic gonadotrophin (β -hCG), pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A), and alpha fetoprotein (AFP) levels in the screening of fetuses with hemoglobin (Hb) Bart's disease among pregnancies at risk.

Materials and Methods Pregnancies at risk for fetal Hb Bart's disease scheduled for cordocentesis at 18 to 22 weeks were recruited into the study. Maternal serum-free β -hCG, PAPP-A, and AFP concentrations were measured before cordocentesis, and the final fetal diagnosis of Hb Bart disease was based on fetal Hb typing using high-performance liquid chromatography.

Results Of 57 recruited pregnancies, 11 had fetal Hb Bart's disease and 46 were unaffected. Maternal serum alpha-fetoprotein (MSAFP) concentrations were significantly higher in women with fetal Hb Bart's disease than those with unaffected fetuses (median 99.53 vs 50.83, $P < 0.001$), whereas the concentrations of free β -hCG and PAPP-A were not significantly different between the two groups ($P = 0.543$ and 0.777 , respectively).

Conclusion Second-trimester MSAFP may be clinically a useful screening test for fetal Hb Bart's disease among pregnancies at risk. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS: fetus; Hb Bart's disease; β -human chorionic gonadotropin; pregnancy-associated plasma protein-A; alpha-fetoprotein

INTRODUCTION

Fetal homozygous α -thalassaemia-1 or hemoglobin (Hb) Bart's disease is the most common cause of hydrops fetalis in Southeast Asia (SEA) (Lemmens-Zygluska *et al.*, 1996). As a consequence of fetal anemia, hydropic changes, cardiomegaly, hepatomegaly, and placentomegaly can occur as early as in late first trimester. Prenatal diagnosis can be made using invasive techniques, such as chorionic villus sampling, amniocentesis, or cordocentesis, which can be associated with procedure-related risk of fetal loss. Noninvasive techniques have been developed for diagnosis among pregnancies at risk using ultrasonographic markers, such as cardiothoracic ratio, placental thickness, and middle cerebral artery peak systolic velocity (Tongsong *et al.*, 1999a, 1999b; Srisupundit *et al.*, 2010). Though highly effective, these methods require ultrasound machines and experienced sonographers leading to limitations for wide application. Thus, other noninvasive prenatal diagnosis techniques available for wide use are desirable. Maternal serum levels of free β -human chorionic gonadotropin (β -hCG), pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A), and alpha fetoprotein (AFP) have been reported to be associated with fetal hydropic changes (Saller *et al.*, 1996) and enlarged placenta, which are the characteristics of pregnancies with fetal

Hb Bart's disease (Tseng *et al.*, 1994; Ong *et al.*, 2006). Though these maternal serum markers have never been thoroughly studied in pregnancies with fetal anemia secondary to Hb Bart's disease, the levels of these serum markers may potentially be increased in this fetal disorder, which is related to anemia, enlarged placenta, and hepatomegaly. Therefore, we hypothesize that these serum markers may be effective in predicting Hb Bart's disease, especially among pregnancies at risk. The aim of this study was to compare the levels of maternal serum-free β -hCG, PAPP-A, and AFP between pregnancies with fetal Hb Bart's disease and unaffected pregnancies.

MATERIALS AND METHODS

This study was prospectively conducted at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University with approval of the Research Ethical Committee. Pregnant women at risk for fetal Hb Bart's disease and scheduled for cordocentesis at 18 to 22 weeks between October 2009 and June 2010 were enrolled to the study. Pregnancies were considered at risk when both parents were diagnosed as α -thalassaemia-1 carrier using PCR [Southeast Asia (SEA)-type] technique. The gestational age was determined by a certain last menstrual period and confirmed either by sonographic crown-rump length in the first trimester or biparietal diameter in the second trimester. Exclusion criteria included

*Correspondence to: Theera Tongsong, Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand.
E-mail: ttongson@mail.med.cmu.ac.th

Table 1—Characteristics of the pregnancies affected with Hb Bart's disease and unaffected pregnancies

	Hb Bart's group (mean \pm SD)	Non-Hb Bart's group (mean \pm SD)	P value
Maternal age (years)	26.8 \pm 5.7	27.9 \pm 5.4	0.57
Gestational age at sampling (weeks)	19.4 \pm 0.8	19.4 \pm 1.1	0.97
Maternal body weight (kg)	58.3 \pm 11.1	56.6 \pm 8.0	0.39

SD, standard deviation.

(1) multiple pregnancies, (2) fetal anomalies or chromosomal abnormalities, (3) fetal anemia secondary to causes other than Hb Bart's disease as well as pregnancies at risk for rhesus alloimmunization, (4) known maternal medical diseases, and (5) fetal blood samples could not be obtained or were contaminated with maternal blood.

After informed and written consent was obtained, the demographic characteristics and medical history were recorded. A maternal blood sample was collected by venipuncture and was allowed to clot. The serum was separated by centrifugation as soon as possible and stored at -20°C . Free β -hCG, PAPP-A, and AFP concentrations were measured using the 6000 DELFIA[®] Xpress clinical random access screening platform, PerkinElmer Life, and Analytical Sciences, Turku, Finland. A transabdominal sonographic examination was performed for fetal biometry and fetal anatomical survey. Cordocentesis was then carried out under transabdominal real-time ultrasound guidance. Fetal blood sample was collected and tested for maternal blood contamination using a simple acid elution test. Hemoglobin typing was based on high-performance liquid chromatography, and DNA analysis (if needed) was used for the fetal thalassemia status. All prenatal results were confirmed after birth or termination of pregnancy.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The mean maternal serum-free β -hCG, PAPP-A, and AFP concentrations in the pregnant women whose fetuses were affected with Hb Bart's disease were compared with those whose fetuses were unaffected (normal Hb typing or α -thalassaemia-1 carrier) using Mann-Whitney *U*-test. The analysis of covariance (ANCOVA) was also used to determine the significance of the difference between the groups by adjusting for the gestational age which might be a confounder. Based on a previous study reported Bartha *et al.* (2003), we calculated that a sample size of at least seven cases in each group would be needed to gain 80% power of test at 95% confidence interval. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Fifty-nine pregnant women were recruited into the study and maternal serum samples were collected and

analyzed. There were no fetal losses related to the cordocentesis. Two fetuses were diagnosed with hemoglobin H/Constant spring disease and were excluded from the study. The remaining 57 pregnancies were available for analysis and their baseline characteristics are shown in Table 1. As many as 11 fetuses (19%) were identified as affected with Hb Bart's disease, whereas the remaining 46 fetuses were unaffected (18 were α -thalassaemia-1 carriers and 28 had normal hemoglobin typing). No statistically significant difference in maternal age, gestational age at sampling, and maternal body weight was found between the two groups (Table 1). After adjusting for gestational age, using ANCOVA, maternal serum alpha fetoprotein (MSAFP) concentrations were significantly higher in pregnancies with fetuses affected by Hb Bart's disease than in those with unaffected fetuses (Mann-Whitney test; $P = 0.000$) (Figure 1). AFP levels were similar in pregnancies with fetuses α -thalassaemia-1 carriers and normal hemoglobin ($P = 0.81$). Of fetuses with Hb Bart's disease, three had some degree of hydropic changes and five had placental thickness of 3 cm or more. However, all had cardiomegaly and 9 out of 11 showed significantly higher peak systolic velocity of MCA, above 1.5 MoM.

The concentrations of free β -hCG and PAPP-A were not significantly different between pregnancies with Hb Bart's disease and controls (Mann-Whitney test; $P = 0.543$ and 0.777 , respectively) (Table 2).

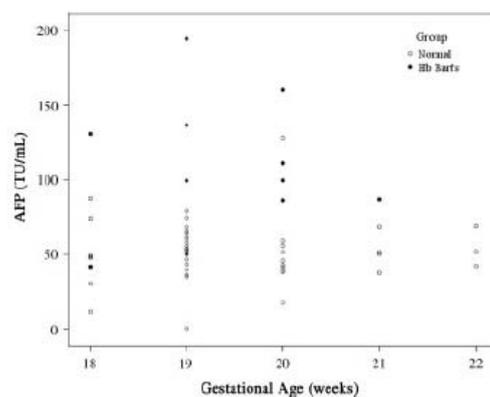


Figure 1—Maternal serum alpha fetoprotein (MSAFP) concentration in pregnancies affected with homozygous α -thalassaemia-1 disease (solid dot) and the unaffected pregnancies (open dot) at 18 to 22 weeks of gestation

Table 2—Maternal serum-free β -hCG, PAPP-A, and AFP concentration in pregnancies affected with homozygous α -thalassaemia-1 disease group and the unaffected group

	Hb Bart's group, Median (ranges)	Non Hb Bart's group Median (ranges)	P value*
Free β -hCG (ng/mL)	8.50 (1.8–20.8)	8.10 (1.5–37.0)	0.543
PAPP-A (mU/L)	14 306 (4329–19061)	12 737 (2755–29 066)	0.777
AFP (IU/mL)	99.53 (41–194)	50.83 (5–128)	<0.001

β -hCG, β -fetoprotein-human chorionic gonadotrophin; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein-A; AFP, alpha.

* Mann–Whitney *U*-test.

DISCUSSION

Homozygous α -thalassaemia-1 or Hb Bart's disease is one of the most common causes of severe fetal anemia and is uniformly lethal. Fetuses with Hb Bart's disease have a defect in alpha globin chain production resulting in gamma-4 tetramers (Hb Bart's) formation. Hb Bart binds oxygen with high affinity leading to fetal tissue hypoxia. In response, compensatory erythropoiesis is extensively developed, with extramedullary erythropoiesis in the fetal liver and spleen, and in the placenta. An affected fetus manifests as hydrops fetalis, subcutaneous edema, cardiomegaly, hepatomegaly, and placentomegaly, though these sonographic signs may be subtle in early gestation. Theoretically, placental edema can abnormally affect placental hormones production or alter fetomaternal biochemical exchange. Consequently, maternal serum biochemical markers could be useful in identifying pregnancies affected by fetal Hb Bart's disease. We have found that MSAFP level at 18 to 22 weeks, but not free β -hCG or PAPP-A, can allow the detection of the majority of fetuses with Hb Bart's disease.

MSAFP has been found to be elevated in pregnant women with fetal anemia, such as parvovirus B19 infection and rhesus alloimmunization (Komischke *et al.*, 1997; Bartha *et al.*, 2003). Bartha *et al.* (2003) reported that MSAFP levels in pregnancies with fetal anemia from alloimmunization were significantly higher than those in pregnancies with normal fetuses (1.7 vs 0.8 MoM) (Bartha *et al.*, 2006). Little is known about any association between Hb Bart's disease and AFP concentrations. Manoukian *et al.* (1990) reported that MSAFP level was increased to 3 MoM in a fetus with Hb Bart's disease at 28 weeks of gestation. To our best knowledge, ours is the first study to compare the MSAFP levels between pregnancies affected with fetal Hb Bart's disease and unaffected pregnancies. Our finding suggests that MSAFP levels at mid-pregnancy may be useful in predicting fetal Hb Bart's disease in pregnancies at risk at mid-pregnancy. MSAFP elevation in the presence of fetal anemia is hypothesized to be caused by a greater feto-maternal transfer due to placental edema and an activation of placental erythropoiesis (Bartha *et al.*, 1999). It is also possible that involvement of fetal liver by extramedullary erythropoiesis caused by Hb Bart's disease may lead to elevated AFP production. The weakness of this study was the limited sample size, which hampered an accurate calculation of the diagnostic accuracy of MSAFP in predicting Hb Bart's disease. Larger studies are needed to confirm the effectiveness

of MSAFP in the prediction of this condition. Note that hydropic changes or placentomegaly was found in only about one third of cases at the time of ultrasound examination. This suggests that an increase in MSAFP level may precede morphological change of the placenta and be possibly helpful in earlier diagnosis.

Abnormally high levels of free β -hCG have been reported in hydropic fetuses (Saller *et al.*, 1992, 1996; Spencer *et al.*, 2000; Benn *et al.*, 2002). In a first trimester study, maternal serum-free β -hCG in 22 women with fetuses affected by Hb Bart's disease than in 436 controls (1.41 vs 0.92 MoM) (Ong *et al.*, 2006). The hCG elevation associated with fetal Hb Bart's disease seems to increase with advancing gestational age, so that 78% (14/18) of affected pregnancies had hCG levels >2.5 MoM between 14 and 23 weeks (Tseng *et al.*, 1994). Our study could not demonstrate the statistical difference between Hb Bart's disease and unaffected fetuses at mid-pregnancy perhaps owing to the limited power of our study.

Pregnancies with low levels of PAPP-A are associated with a higher risk of pregnancy-induced hypertension and fetal growth restriction, suggesting that maternal serum PAPP-A levels may be indicative of placental function (Yaron *et al.*, 2002). We could not show a significant difference in PAPP-A levels between fetuses with Hb Bart's disease and unaffected fetuses at 18 to 22 weeks of gestational age. This finding is consistent with that reported by Ong *et al.*, who found that PAPP-A levels at 11 to 14 weeks of gestational age in pregnancies affected by fetal Hb Bart's disease were not significantly different from the control group (1.16 vs 1.04 MoM) (Ong *et al.*, 2006).

In conclusion, MSAFP levels, but not free beta-hCG and PAPP-A levels, are significantly higher in pregnancies with fetal Hb Bart's disease than in unaffected ones. Based on these findings, MSAFP concentrations have a potential to be used as a predictor of pregnancies affected by fetal Hb Bart's disease among pregnancies at risk. More studies are needed before this noninvasive and commonly available screening method can be used in clinical practice to avoid invasive prenatal diagnosis of Hb Bart's disease.

REFERENCES

- Bartha JL, Comino-Delgado R, Arce F, Alba P, Brouillon JR, Barahona M. 1999. Relationship between alpha-fetoprotein and fetal erythropoiesis. *J Reprod Med* 44: 689–697.
- Bartha JL, Harrison G, Kyle PM, Soothill PW. 2003. Fetal serum alpha-fetoprotein in alloimmunised pregnancies. *Prenat Diagn* 23: 917–920.

- Bartha JL, Illanes S, Abdel-Fattah SA, Harrison G, Soothill PW. 2006. Maternal serum alpha-fetoprotein, fetal middle cerebral artery blood flow velocity and fetal haemoglobin in pregnancies at risk of fetal anaemia. *Prenat Diagn* **26**: 101–104.
- Benn PA, Egan JF, Ingardia CJ. 2002. Extreme second-trimester serum analyte values in down syndrome pregnancies with hydrops fetalis. *J Matern Fetal Neonatal Med* **11**: 262–265.
- Komischke K, Searle K, Enders G. 1997. Maternal serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in pregnant women with acute parvovirus B19 infection with and without fetal complications. *Prenat Diagn* **7**: 1039–1046.
- Lemmens-Zygulska M, Eigel A, Helbig B, Sanguansernsri T, Horst J, Flatz G. 1996. Prevalence of alpha-thalassemias in northern Thailand. *Hum Genet* **98**: 345–347.
- Manoukian AA, Bhagavan NV, Oshiro TH, Scottolini AG. 1990. Concentrations of alpha-fetoprotein increased in maternal serum but normal in amniotic fluid in a pregnancy involving hemoglobin Bart's disease. *Clin Chem* **36**: 822.
- Ong CY, Lee CP, Leung KY, Lau E, Tang MH. 2006. Human chorionic gonadotropin and plasma protein-A in alpha⁰-thalassemia pregnancies. *Obstet Gynecol* **108**(3 Pt 1): 651–655.
- Saller DN Jr, Canick JA, Oyer CE. 1996. The detection of non-immune hydrops through second-trimester maternal serum screening. *Prenat Diagn* **16**: 431–435.
- Saller DN Jr, Canick JA, Schwartz S, Blitzer MG. 1992. Multiple-marker screening in pregnancies with hydropic and nonhydropic Turner syndrome. *Am J Obstet Gynecol* **167**(4 Pt 1): 1021–1024.
- Spencer K, Liao AW, Skentou H, Cicero S, Nicolaides KH. 2000. Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10–14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* **20**: 495–499.
- Srisupundit K, Piyamongkol W, Tongprasert F, Luewan S, Tongsong T. 2010. Reference range of fetal splenic circumference from 14 to 40 weeks of gestation. *Arch Gynecol Obstet*. [Epub ahead of print]. PMID: 20135134.
- Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S. 1999a. Placental thickness at mid-pregnancy as a predictor of Hb Bart's disease. *Prenat Diagn* **19**: 1027–1030.
- Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. 1999b. Fetal sonographic cardiothoracic ratio at midpregnancy as a predictor of Hb Bart disease. *J Ultrasound Med* **18**: 807–811.
- Tseng LH, Hwa HL, Chuang SM, Lee TY, Ko TM. 1994. Increased level of second trimester maternal serum chorionic gonadotropin in pregnancy with a fetus affected by homozygous alpha-thalassemia 1. *Arch Gynecol Obstet* **255**: 113–117.
- Yaron Y, Heifetz S, Ochshorn Y, Lehavi O, Orr-Urtreger A. 2002. Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* **22**: 778–782.

2. Tongprasert F, Wanapirak C, Tongsong T. The Difference of Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) between Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses and Non-Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses.
(In preparation for submission in Prenatal Diagnosis)

The Difference of Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) between Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses and Non-Homozygous Alpha Thalassemia-1 Fetuses

Tongprasert, F.^{1*}, Wanapirak, C.¹ Tongsong, T.¹

¹*Maternal Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*

Abstract

Background: Maternal serum levels of free β -hCG and PAPP-A are correlated with placental volume and placentomegaly is usually found in pregnancies with fetal Hb Bart's disease. Therefore, we hypothesize that these serum markers may be higher in fetuses affected by hemoglobin (Hb) Bart's disease.

Objective: To evaluate the levels of maternal serum free β -hCG and PAPP-A in identifying fetuses with Hb Bart's disease among pregnancies at risk.

Materials and Methods: One hundred and forty eight pregnancies at risk for fetal Hb Bart's disease scheduled for cordocentesis at 18 to 22 weeks were recruited into the study. Maternal serum free β -hCG and PAPP-A concentrations were measured before cordocentesis, and the final fetal diagnosis of Hb Bart's disease was based on fetal Hb typing using high-performance liquid chromatography.

Results: Maternal serum concentration of free β -hCG was significantly higher in women with fetal Hb Bart's disease than those with unaffected fetuses ($P = 0.018$), whereas the concentrations of PAPP-A was not significantly different ($P = 0.184$). The median MoM of free β -hCG in the affected group was 1.38 MoM and in the unaffected group was 0.88 MoM ($P = 0.020$).

Conclusion: At midpregnancy, maternal serum free β -hCG in pregnancies with fetal Hb Bart's disease is significantly higher than in the unaffected pregnancies whereas PAPP-A level seems to be similar in both groups.

Keywords: hemoglobin Bart's disease, maternal serum marker, free β -human chorionic gonadotropin, pregnancy-associated plasma protein-A, alpha-fetoprotein

*Corresponding author.

Tel.: 0-5394-5552; Fax: 0-5394-6112

E-mail: fpunyath@med.cmu.ac.th

Manuscript

Introduction

Fetal homozygous α -thalassemia-1 or hemoglobin (Hb) Bart's disease is the most common cause of hydrops fetalis in Thailand. As a consequence of fetal anemia, the hydropic changes manifested by cardiomegaly, hepatomegaly, skin edema, ascites and placentomegaly finally occur. Prenatal diagnosis can be made using invasive technique such as chorionic villus sampling, amniocentesis or cordocentesis which can be associated with fetal loss. Noninvasive techniques have been developed for diagnosis among pregnancy at risk, using ultrasonographic markers such as cardiothoracic ratio, placental thickness and middle cerebral artery peak systolic velocity(1-3). Though high effectiveness, these methods require ultrasound machines and experienced sonographers leading to limitations for wide application. Thus the unsophisticated noninvasive prenatal diagnosis techniques are yet to be sought for. Maternal serum levels of free β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) have been reported to be associated with fetal hydropic change(4) and enlarged placenta which are the characteristics of pregnancies with fetal Hb bart's disease(5, 6). Though these maternal serum markers have never been thoroughly studied in pregnancies with fetal anemia secondary to Hb Bart's disease, the levels of these serum markers may potentially be increased in this fetal condition, which is related to anemia, enlarged placenta and hepatomegaly. Therefore, we hypothesize that these serum markers may probably be effective in predicting of Hb Bart's disease, especially among pregnancies at risk. The aim of this study was to compare the levels of maternal serum free β -hCG and PAPP-A between pregnancies with fetal homozygous α -thalassemia-1 and unaffected pregnancies.

Materials and Methods

This study was prospectively conducted at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University with approval of the Research Ethical Committee. Pregnant women at risk for homozygous α -thalassemia-1 fetuses who scheduled for cordocentesis at 17 to 22 weeks between October 2009 and September 2011 were enrolled to the study. Pregnancy at risk was confirmed when both of the couple were diagnosed for α -thalassemia-1 carrier, using PCR (SEA-type) technique. The gestational age was determined by a certain last menstrual period and confirmed either by sonographic crown-rump length in the first trimester or biparietal diameter in the second trimester. Exclusion criteria included the following: 1) multiple pregnancies; 2) fetal anomalies or chromosomal abnormalities; 3) fetal anemia secondary to any causes other than Hb Bart's disease as well as pregnancies at risk for rhesus alloimmunization; 4) known maternal medical diseases and 5) fetal blood samples could not be obtained or were contaminated with maternal blood.

After informed and written consent was obtained, the demographic characteristics and medical history were recorded. Maternal blood sample was collected by venipuncture and was allowed to clot. The serum was separated by centrifugation as immediate as possible and stored at -20°C . Free β -hCG and PAPP-A concentrations were measured using the 6000 DELFIA[®] Xpress clinical random access screening platform, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland. A transabdominal sonographic examination was performed for fetal biometry and fetal anatomical survey.

Cordocentesis was then carried out under transabdominal real-time ultrasound guidance. Fetal blood sample was collected and tested for maternal blood contamination using a simple acid elution test. Hemoglobin typing using high-performance liquid chromatography and DNA analysis (if needed) were analyzed for the fetal thalassemia status.

Statistical analysis: All statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). The demographic characteristics were described and analyzed to determine the difference between the affected group (the pregnant women whose fetuses were affected with homozygous α -thalassemia-1) and the unaffected group (the pregnant women whose fetuses were normal Hb typing or α -thalassemia-1 carrier) by the independent samples T-test. The maternal serum free β -hCG and PAPP-A (expressed as concentrations and a multiple of the normal median for gestation; MoM) were compared between the groups using the Mann-Whitney U test. The significance serum analyte's ability to discriminate between the affected pregnancies compared with the unaffected pregnancies was then evaluated by the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve. The performance of maternal serum markers, choosing a threshold based on the area under the ROC curve, were determined by calculating sensitivity, specificity and positive and negative predictive values. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

One hundred and forty eight pregnant women were recruited to the study and maternal serum samples were collected and analyzed. The fetuses affected with homozygous α -thalassemia-1 disease and those unaffected (α -thalassemia-1 carriers and normal hemoglobin typing) fetuses were identified in 28 cases (18.9%) and 117 cases (79.1%), respectively. 3 fetuses (2.0%) were diagnosed for hemoglobin H / Constant spring disease and were excluded from the study. The remaining 145 pregnancies were available for analysis and their baseline characteristics are shown in Table 1. No statistically significant difference in maternal age, gestational age at sampling and maternal body weight was found between the two groups ($P > 0.05$). Maternal serum concentrations of free β -hCG was significantly higher in pregnancies with fetuses affected by homozygous α -thalassemia-1 disease than in those with unaffected fetuses ($P = 0.018$), whereas the concentrations of PAPP-A was not significantly different ($P = 0.184$) as presented in Table 2. The median MoM of free β -hCG in the affected group was also significantly higher than the unaffected group (1.38 MoM versus 0.88 MoM, $P = 0.020$). The ROC curves of maternal serum free β -hCG concentrations and free β -hCG MoM for predicting homozygous α -thalassemia-1 disease were demonstrated in Figure 1. The areas under the ROC curves of free β -hCG concentrations and free β -hCG MoM were 0.655 (95% CI 0.539 - 0.771) and 0.647 (95% CI 0.528 - 0.767), respectively. The predictive values for the detection of homozygous α -thalassemia-1 disease during midpregnancy using different cut-off free β -hCG MoM were shown in Table 3.

Table 1: The characteristics of the pregnancies affected with homozygous α -thalassemia-1 disease group and the unaffected group.

	Affected group	Unaffected group	<i>P</i> -value
Maternal age (years) <ul style="list-style-type: none"> • Mean \pm standard deviation • Range 	29.58 \pm 6.68 17 – 41	27.82 \pm 6.01 16 – 45	0.19
Gestational age at sampling (weeks) <ul style="list-style-type: none"> • Mean \pm standard deviation • Range 	18.43 \pm 0.96 17 – 20	18.66 \pm 0.91 17 – 21	0.24
Maternal body weight (kilograms) <ul style="list-style-type: none"> • Mean \pm standard deviation • Range 	57.76 \pm 11.73 39.1 – 97.5	56.73 \pm 9.49 38.2 – 101.1	0.63

Table 2: Maternal serum free β -hCG and PAPP-A concentration in pregnancies affected with homozygous α -thalassemia-1 disease group and the unaffected group.

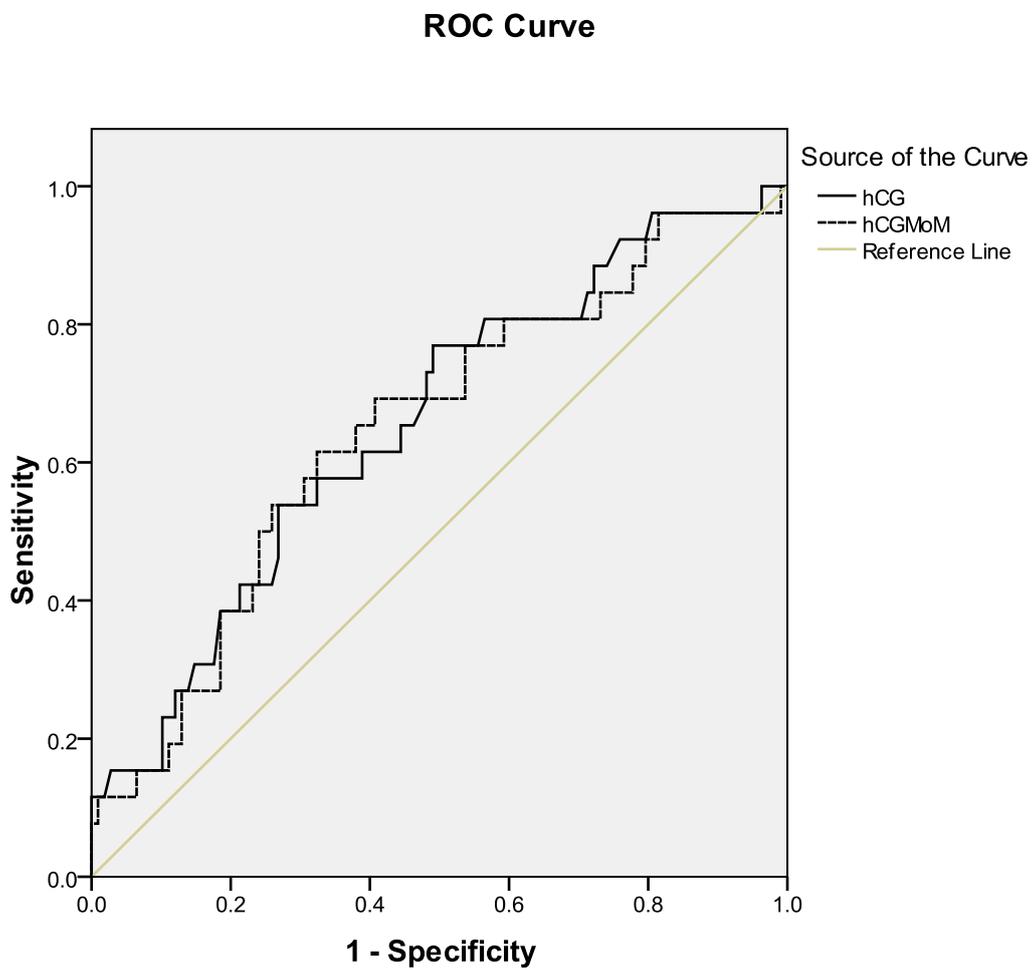
	Affected group	Unaffected group	<i>P</i> -value
Free β -hCG (ng/mL) <ul style="list-style-type: none"> • Median • Range 	12.3 1.8-66.8	8.4 1.0-37.4	0.018
PAPP-A (mU/L) <ul style="list-style-type: none"> • Median • Range 	15169.2 4329.3-27313.9	13540.9 3478.6-29821.5	0.184

Table 3: Predictive value of maternal serum free β -hCG MoM for pregnancies affected with homozygous α -thalassemia-1 disease.

	≥ 1.1 MoM	≥ 1.2 MoM	≥ 1.3 MoM	≥ 1.4 MoM	≥ 1.5 MoM

Sensitivity	57.1	50.0	50.0	46.4	35.7
Specificity	68.4	73.5	75.2	76.9	81.2
PPV	30.2	31.1	32.6	32.5	31.3
NPV	87.0	86.0	86.3	85.7	84.1
Odd ratio	2.9	2.7	3.0	2.9	2.4
Accuracy rate	66.2	68.9	70.3	71.0	72.4
False positive rate	31.6	26.5	24.8	23.1	18.8

Figure 1: ROC curves of maternal serum free β -hCG concentration and free β -hCG MoM for predicting pregnancies affected with homozygous α -thalassemia-1 disease.



Test Result Variable(s)	Area	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
hCG	0.655	0.014	0.539	0.771
hCG MoM	0.647	0.020	0.528	0.767

Discussion

Homozygous α -thalassemia-1 or Hb Bart's disease is one of the common causes of severe fetal anemia. The extramedullary erythropoiesis in fetal liver, spleen and placenta is compensatory developed from fetal tissue hypoxia. The affected fetus manifests as hydrops fetalis, subcutaneous edema, cardiomegaly, hepatomegaly and placentomegaly. Theoretically, placental edema can abnormal produce placental hormones or alter fetomaternal biochemical exchange. Consequently, some maternal serum biochemical markers may be useful in identifying pregnancies affected Hb Bart's hydrops fetalis.

Free β -hCG

Free β -hCG has been reported in a higher level than normal in fetuses with chromosomal abnormalities such as Down syndrome, Turner syndrome and triploidy, especially in hydropic fetuses(4, 7-9). During the first trimester, maternal serum free β -hCG has been shown to be significantly higher in pregnancies affected by Hb Bart's disease than those in the control group (1.41 MoM in 22 affected group vs 0.92 MoM in 436 control group)(5). The hCG elevation associated with fetal Hb Bart's disease seems to increase with advancing gestational age, so that 78% (14/18) of affected pregnancies had hCG levels >2.5 MoM between 14 and 23 weeks(6).

In our study, we have found the statistical difference between Hb Bart's disease and unaffected fetuses at 18 – 22 weeks of gestation. The levels of free β -hCG in pregnancies with affected fetuses were significantly higher than those in pregnancies with unaffected fetuses (1.38 MoM vs 0.88 MoM). However, free β -hCG levels > 2.5 MoM and levels > 1.5 MoM were found only 15% (4/26) and 38% (10/26), respectively. Therefore, the effectiveness of free β -hCG as a predictor for Hb Bart's disease is not attractive because of high false positive rate.

In aspect of Down syndrome screening, free β -hCG has been used in both first and second trimester Down syndrome screening test. Free β -hCG levels in pregnancies affected with Down syndrome is higher than unaffected pregnancies with the median of 2.22 MoM(10). Therefore, the calculated Down syndrome risk in pregnant women who carry Hb Bart's fetuses may be higher than usual. Consequently, the high false positive rate in Down syndrome screening program in area of the high prevalence in pregnancies at risk of homozygous α -1 disease is predicted.

PAPP-A

Of fetuses with chromosomal abnormalities such as trisomy 21, trisomy 13, trisomy 18, sex chromosome aneuploidy and triploidy, it has been shown that PAPP-A levels are higher than those in normal fetuses(9, 11). In pregnancies with the low levels of PAPP-A, the risk of pregnancy induced hypertension and fetal growth restriction has been increased which imply that maternal serum PAPP-A levels are related to abnormal placental function(12). Hypothetically, placental edema as seen in Hb Bart's hydrop fetalis is likely to have an effect on PAPP-A value, higher than is in normal fetus. However, this study could not show a significant difference in PAPP-A levels between fetuses with Hb Bart's disease and unaffected fetuses at 18 – 22 weeks of gestational age. This finding was consistent with that reported by Ong CY et al, who found that PAPP-A in pregnancies affected by fetal Hb Bart's disease were not significantly different from the control group (1.16 MoM vs 1.04 MoM) at 11 – 14 weeks of gestational age(5).

In conclusion, maternal serum free β -hCG in pregnancies with fetal Hb Bart's disease is significantly higher than in the unaffected ones whereas PAPP-A level seems to be similar in both groups. However, the efficacy of free β -hCG alone as a predictor of pregnancies affected by fetal Hb Bart's disease among pregnancies at risk is relatively low. The other ultrasound markers such as cardiothoracic ratio, placental thickness, peak systolic velocity of middle cerebral artery or the other serum analytes may be further investigated to be used in combination with free β -hCG in Hb Bart's disease screening program.

References

1. Srisupundit K, Piyamongkol W, Tongsong T. Identification of fetuses with hemoglobin Bart's disease using middle cerebral artery peak systolic velocity. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:694-7.
2. Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S. Placental thickness at mid-pregnancy as a predictor of Hb Bart's disease. *Prenatal diagnosis* 1999;19:1027-30.
3. Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Fetal sonographic cardiothoracic ratio at midpregnancy as a predictor of Hb Bart disease. *J Ultrasound Med* 1999;18:807-11.
4. Saller DN, Jr., Canick JA, Oyer CE. The detection of non-immune hydrops through second-trimester maternal serum screening. *Prenatal diagnosis* 1996;16:431-5.
5. Ong CY, Lee CP, Leung KY, Lau E, Tang MH. Human chorionic gonadotropin and plasma protein-A in alpha 0 -thalassemia pregnancies. *Obstetrics and gynecology* 2006;108:651-5.
6. Tseng LH, Hwa HL, Chuang SM, Lee TY, Ko TM. Increased level of second trimester maternal serum chorionic gonadotropin in pregnancy with a fetus affected by homozygous alpha-thalassemia 1. *Archives of gynecology and obstetrics* 1994;255:113-7.
7. Benn PA, Egan JF, Ingardia CJ. Extreme second-trimester serum analyte values in down syndrome pregnancies with hydrops fetalis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002;11:262-5.
8. Saller DN, Jr., Canick JA, Schwartz S, Blitzer MG. Multiple-marker screening in pregnancies with hydropic and nonhydropic Turner syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology* 1992;167:1021-4.
9. Spencer K, Liao AW, Skentou H, Cicero S, Nicolaides KH. Screening for triploidy by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenatal diagnosis* 2000;20:495-9.
10. Wald N, Densem J, Stone R, Cheng R. The use of free beta-hCG in antenatal screening for Down's syndrome. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1993;100:550-7.
11. Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, Rudnicka A. SURUSS in perspective. *Seminars in perinatology* 2005;29:225-35.
12. Yaron Y, Heifetz S, Ochshorn Y, Lehavi O, Orr-Urtreger A. Decreased first trimester PAPP-A is a predictor of adverse pregnancy outcome. *Prenatal diagnosis* 2002;22:778-82.