



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกทารกในครรภ์
ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทโดยใช้
ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล
(Identification of homozygous alpha-thalassemia-1
(hemoglobin Bart's) fetuses using
Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery)

โดย พ.ญ. เกษมศรี ศรีสุพรรณดิฐ
หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กรกฎาคม พ.ศ. 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิด
ฮีโมโกลบินบาร์ทโดยใช้ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล
(Identification of homozygous alpha-thalassemia-1 (hemoglobin
Bart’s) fetuses using Doppler waveform index of
Middle Cerebral Artery)”

ผู้วิจัย พ.ญ. เกษมศรี ศรีสุพรรณดิฐ

สังกัด หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก
ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code: MRG5080175

Project Title: Identification of homozygous alpha-thalassemia-1 (hemoglobin Bart's) fetuses using Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery

Investigator:

Principle investigator: Kasemsri Srisupundit, M.D.

Co-investigator: Wirawit Piyamongkol, M.D., Ph. D

Mentor: Theera Tongsong, M.D.

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

E-mail Address: ksrissupu@mail.med.cmu.ac.th, psrisupundit@yahoo.com

Project Period: 1 year

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5080175

ชื่อโครงการ: การจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทโดยใช้
ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน :

หัวหน้าโครงการ : พญ. เกษมศรี ศรีสุพรรณดิฐ

ผู้ร่วมวิจัย : รศ. นพ. ดร. วีรวิทย์ ปิยะมงคล

นักวิจัยที่ปรึกษา : ศ. นพ. ชีระ ทองสง

หน่วยเวชศาสตร์มารดาและทารก ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: ksrisupu@mail.med.cmu.ac.th, psrisupundit@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 1 ปี

Executive Summary

เนื่องจากการวิจัยนี้มี 2 วัตถุประสงค์ และทำการศึกษาแยกกันเป็น 2 ส่วนค่อนข้างชัดเจน (โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการตีพิมพ์แยกเป็น 2 ผลงาน) จึงขอรายงานในส่วนของ Executive Summary แยกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

งานวิจัยส่วนที่ 1

Title: Identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses using Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery

Objective: To determine the sensitivity and specificity of Middle Cerebral Artery- peak systolic velocity (MCA-PSV) for identification of homozygous alpha thalassemia 1 fetuses at mid-pregnancy among pregnancies at risk

Study design: Diagnostic test

Material & Method: A total of 88 pregnancies (91 fetuses) at risk of homozygous alpha thalassemia-1, undergoing MCA-PSV measurement before performing cordocentesis at 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were recruited into the study. The final diagnoses used as gold standard were based on fetal hemoglobin typing using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The main outcome measure was the sensitivity and specificity of MCA-PSV in predicting homozygous alpha thalassemia-1 fetuses.

Results: Of 88 pregnant women recruited into the study, the mean age was 28.3 ± 5.7 years, the mean gestational age was 18.8 ± 1.06 weeks, and the incidence of homozygous alpha thalassemia-1 was 22% (20 fetuses). If using MCA-PSV above 1.5 Multiple of Median (MoM) as a cut off point, the sensitivity of MCA-PSV to detect homozygous alpha thalassemia-1 fetuses was 85% (17 from 20 cases), specificity was 100%, and the positive predictive value and negative predictive value of MCA-PSV were 100% and 95.89% respectively. Three out of 20 fetuses with homozygous alpha thalassemia-1 had normal MCA-PSV.

Conclusion: MCA-PSV assessment at mid-pregnancy is a useful method to identify homozygous alpha thalassemia-1 fetuses with high sensitivity and specificity, and may reduce risk from unnecessary cordocentesis in some fetuses.

งานวิจัยส่วนที่ 2

Title: Comparison of red blood cell hematology among normal and alpha-thalassemia-1 trait and hemoglobin Bart's fetuses at mid-pregnancy

Objective: To compare red blood cell indices among normal and alpha-thalassemia-1 trait, and hemoglobin Bart's fetuses at mid-pregnancy

Study design: Descriptive study

Material & Method: A total of 87 pregnancies (88 fetuses) at risk of homozygous alpha thalassemia-1, undergoing cordocentesis including measurement of hemoglobin level and red blood cell indices of fetuses at 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were recruited into the study. The final outcome was based on fetal DNA analysis using polymerase chain reaction (PCR) technique. Fetuses were divided into 3 groups which are normal, alpha-thalassemia-1 trait (SEA deletion) and homozygous alpha-thalassemia-1 (Hemoglobin Bart's disease). The main outcome measure was hematology of red blood cell indices and degree of anemia of fetuses in each group.

Results: Of 87 pregnant women recruited into the study, the mean gestational age was 18.7 ± 0.8 weeks. According to DNA analysis, the incidence of hemoglobin Bart's disease, alpha thalassemia-1 trait and normal fetuses were 29.5%, 45.5% and 25% respectively. The mean of hemoglobin level, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean cell hemoglobin concentration (MCHC) were significantly difference in 3 groups of fetuses. Moreover, these differences were also found between fetuses with alpha-thalassemia-1 trait and normal fetuses. Ninety-two percent of fetuses with hemoglobin Bart's disease had some degree of anemia at mid-pregnancy. However, there are two hemoglobin Bart's fetuses which did not have anemia. Furthermore, two fetuses in the alpha-thalassemia-1 trait group were mildly anemic, but most (95%) were not.

Conclusion: There was highly significant difference in hematology of red blood cell indices between normal, alpha-thalassemia-1 trait and Hemoglobin Bart's fetuses, and most fetuses with hemoglobin Bart's disease have some degree of anemia from mid-pregnancy on.

เนื้อหางานวิจัย

เนื่องจากการวิจัยนี้มี 2 วัตถุประสงค์ และทำการศึกษายกกันเป็น 2 ส่วนค่อนข้างชัดเจน (โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการตีพิมพ์แยกเป็น 2 ผลงาน) จึงขอรายงานในส่วนเนื้อหาของงานวิจัยแยกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

เนื้อหางานวิจัยส่วนที่ 1

วัตถุประสงค์ : ศึกษาความไวและความจำเพาะของค่าคลื่นเสียงดอปเพลอร์หลอดเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัล ของทารกในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ เพื่อใช้จำแนกทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท

วิธีทดลอง

มีสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทของทารกในครรภ์ทั้งหมด 88 รายที่เข้าสู่วัยตั้งครรภ์ ซึ่งคิดเป็นจำนวนทารกในครรภ์ทั้งหมด 91 ราย เนื่องจากมีสตรีตั้งครรภ์แฝดรวมอยู่ด้วย สตรีทุกคนตัดสินใจรับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีเจาะเลือดสายสะดือทารก (Cordocentesis) โดยสตรีตั้งครรภ์ทุกรายอยู่ในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ และได้รับการตรวจวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลของทารกในครรภ์ก่อนทำการเจาะเลือดสายสะดือเมื่อ ที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2551

ผู้ตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงและวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลของทารกในครรภ์เป็นแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านเวชศาสตร์มารดาและทารกทั้งหมด 8 ท่าน โดยใช้เครื่องตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงยี่ห้อ Aloka Prosound 5000 หรือ Aloka SSD alpha-10 (Tokyo, Japan) โดยใช้หัวตรวจทางหน้าท้องความถี่ 3.5 เมกกะเฮิรตซ์ ชนิด curvilinear ในส่วนของการวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัลนั้น ได้ทำตามวิธีของ Mari G.[1] ที่ได้บรรยายไว้ดังต่อไปนี้

- สตรีตั้งครรภ์อยู่ในท่านอนหงายหรือตะแคงเล็กน้อย
- ทำการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงทางหน้าท้องตามวิธีมาตรฐาน เช่น การวัดขนาดของทารก (fetal biometry) และการตรวจความสมบูรณ์ของทารก (fetal anatomical survey)

- การวัดด้วยคลื่นเสียงดอปเพลอร์จะกระทำในขณะที่ทารกในครรภ์มีอัตราการเต้นของหัวใจอยู่ในเกณฑ์ปกติคือ 120-160 ครั้งต่อนาที และไม่ได้อยู่ในช่วงที่ทารกในครรภ์หรือมารดากำลังเคลื่อนไหวจากการหายใจ
- มองหาเส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลจากภาพตัดขวางของศีรษะ (transverse plane) โดยอยู่ในวิวกว้างเคียงกับการวัดขนาด Biparietal diameter (BPD) แต่ต่ำลงไปทางด้าน base of skull และเอียงไปทางด้านหลังเล็กน้อย จากนั้นจะพบเส้นเลือด Circle of Willis ที่ระดับใกล้เคียงกับ thalamus ซึ่งจะมีลักษณะเป็น round slightly echogenic pulsation
- เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัล (Middle Cerebral Artery) จะแตกแขนงออกมาจาก circle of Willis ทั้งสองด้าน โดยพุ่งตรงไปทางด้านหน้าและข้างๆต่อเบ้าตาในระดับของกระดูก Sphenoid
- ใช้ระบบ color Doppler ในการตรวจ โดยวาง Doppler gate ที่ตำแหน่งประมาณ 1/3 ทางด้าน proximal ของเส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล และวาง Doppler gate โดยให้มุมของการไหลของเส้นเลือด (angle of insonation) ไม่เกิน 10 องศา
- ทำการวัดค่าดอปเพลอร์โดยเลือกจาก 3 cardiac cycle ที่ waveform ดีที่สุด โดยเลือกจากภาพหนึ่งที่เครื่องตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงประมวลมาให้แล้ว
- ทำการวัดทั้งหมด 3 ครั้ง และนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยกัน

ค่าดอปเพลอร์ที่ถือว่าสูงผิดปกติคือค่า Middle Cerebral Artery-Peak Systolic Velocity (MCA-PSV) ที่เกินกว่า 1.5 Multiple of Median (MoM) ของอายุครรภ์นั้นๆ โดยเปรียบเทียบกับค่าปกติของทารกในครรภ์ในแต่ละอายุครรภ์จากการศึกษาของ ชีระ ทองสง และคณะ[2] ที่ทำในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หลังจากวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลแล้ว จะทำการเจาะเลือดสายสะดือทารก เพื่อส่งตรวจชนิดของฮีโมโกลบิน (fetal hemoglobin typing) โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งถือเป็นการวินิจฉัยที่เป็น gold standard ของการศึกษานี้ ส่วนของผลลัพธ์หลักที่ต้องการวัดในการศึกษานี้คือความไวและความจำเพาะของค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล ในการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทออกจากการตกปกติ

ผลการทดลอง

มีจำนวนสตรีตั้งครรภ์ที่เข้าสู่วัยการศึกษานี้ทั้งหมด 88 ราย โดยคิดเป็นจำนวนทารกในครรภ์ทั้งสิ้น 91 ราย (ซึ่งในจำนวนทารก 91 รายนี้ มี 1 รายที่มีลักษณะคล้ายทารกบวมน้ำจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท แต่ต้องถูกตัดออกจากการศึกษา เนื่องจากไม่สามารถเจาะเลือดสายสะดือได้ และทารกเสียชีวิตในครรภ์ในเวลาต่อมา) อายุเฉลี่ยของสตรีตั้งครรภ์ที่เข้ารับการศึกษาคิดเป็น 28.3 ± 5.7 ปี (ตั้งแต่ 15-44 ปี) และมีอายุครรภ์เฉลี่ย 18.8 ± 1.06 สัปดาห์

ทารกในครรภ์ทั้งหมด 90 รายที่เข้าสู่วัยการศึกษานี้ พบอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทเป็นร้อยละ 22 (ทารกเป็นโรค 20 รายจากทั้งหมด 90 ราย) โดยเมื่อใช้

จุดตัดของดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล ที่ค่ามากกว่า 1.5 MoM (Multiple of Median) จะพบว่าความไวในการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท เท่ากับร้อยละ 85 (จำแนกได้ 17 ราย จากทารกที่เป็นโรคทั้งหมด 20 ราย), ค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 และค่า positive predictive value และ negative predictive value เป็นร้อยละ 100 และ ร้อยละ 95.89 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

เนื่องจากมีทารกในครรภ์ 3 รายที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท และเริ่มมีอาการแสดงคือหัวใจมีขนาดโตผิดปกติแล้ว แต่ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดงมิตเดิล ซีรีบรัลไม่มากกว่าจุดตัดที่กำหนดไว้ อย่างไรก็ตามพบว่าค่าดอปเพลอร์ของทารกทั้ง 3 คนดังกล่าว มีค่าที่ใกล้เคียงกับจุดตัดที่ 1.5 MoM มาก ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1: แสดงผลการตรวจวินิจฉัยโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทโดยวิธี HPLC และแสดงค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิตเดิล ซีรีบรัล

HPLC (cases)		
	Hemoglobin Bart's fetuses	Non hemoglobin Bart's fetuses
MCA-PSV		
> 1.5 MoM	17	0
≤ 1.5 MoM	3	70

Sensitivity of MCA-PSV	=	85%	(95% CI 0.69-1.00)
Specificity of MCA-PSV	=	100%	(95% CI 1.00-1.00)
Positive predictive value	=	100%	(95% CI 1.00-1.00)
Negative predictive value	=	95.89%	(95% CI 0.86-1.05)

ตารางที่ 2: แสดงรายละเอียดของทารก 3 รายที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท แต่ค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัลไม่มากกว่าจุดตัดที่ 1.5 MoM

Case	GA [#]	MCA-PSV (cm/sec)	1.5 MoM of MCA-PSV	Hb ^{\$} level	Degree of anemia [*]	C/T Ratio (%)
1	19	32.6	33.0	8.7	Mild	54
2	20	33.4	35.1	6.5	Moderate	61
3	18	28.2	30.9	6.9	Mild	60

: Gestational age (weeks), \$: Hemoglobin (gm/dl),

* : Diagnosed from nomogram of fetal hemoglobin level at each gestational age [3]

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล ของทารกในครรภ์ จัดเป็นวิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยและวางแผนการรักษาภาวะทารกซิดจากสาเหตุต่างๆ นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆต่อทารก [1, 3-17] ถึงแม้ว่าในช่วงไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล จะจำแนกทารกที่มีภาวะซิดออกจากทารกปกติได้ค่อนข้างยาก [18] แต่มีการศึกษาหนึ่งที่พบว่าการใช้ค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล ในช่วงไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ ยังมีประโยชน์ในการวินิจฉัยภาวะซิดของทารกในครรภ์ได้ [13]

ในปัจจุบันมีการศึกษาไม่มากนักที่เกี่ยวกับ การใช้ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัลในการวินิจฉัยและวางแผนการรักษาในกรณีทารกที่มีความเสี่ยงในการเกิดภาวะซิดจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท และถึงแม้ว่าผลจากหลายการศึกษาพบว่าการใช้ค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล น่าจะมีประโยชน์ในภาวะดังกล่าว[11, 18, 19] แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาที่ประเมินถึงประสิทธิภาพของการจำแนกทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทและมีภาวะซิดออกจากทารกปฏ่มปกติ ในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์มาก่อน

ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้นว่า โรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทเป็นสาเหตุของทารกบวมน้ำที่พบได้บ่อยที่สุดในประเทศไทยและประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งจากประสบการณ์ที่ผ่านมาพบว่ามีทารกในครรภ์ถึงร้อยละ 75 ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ที่ต้องรับความเสี่ยงของการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยวิธีที่รุกราน เช่นการเจาะเลือดสายสะดือทารก (Cordocentesis) ดังนั้นการศึกษานี้จึงหวังผลว่าการนำประโยชน์ของค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัลมาใช้ น่าจะช่วยลดความเสี่ยงของทารกที่ต้องได้รับการเจาะเลือดสายสะดือทารกโดยไม่มีความจำเป็นลงได้

ในการศึกษานี้ไม่ได้คัดสรรตั้งครรภ์แฝดออกจากกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากมีหลักฐานว่าค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล ในทารกครรภ์แฝดที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อนจะไม่แตกต่างกับทารกในครรภ์เดี่ยวแต่อย่างใด[20] และแม้ว่าการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิตเดิล ซีรีบรัล สามารถทำได้โดยไม่ยากนัก แต่ถ้าผู้วัดไม่มีความชำนาญมากพอ และได้ค่าที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงมากเกินไปและแปลผลผิดพลาด อาจส่งผลเสียต่อผู้ป่วยได้[15, 21] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้มีการเตรียมความพร้อมของแพทย์สาขาเวชศาสตร์มารดาและทารกทั้ง 8 ท่าน ซึ่งเป็นผู้วัดค่าดอปเพลอร์ให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน เพื่อลดความแปรปรวนจากการวัดให้มากที่สุด[1, 22]

จากผลการศึกษาพบว่าค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล มีความไวและความจำเพาะในการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท เท่ากับร้อยละ 85 และ ร้อยละ 100 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่า Positive และ Negative predictive value สูง คือร้อยละ 100 และ ร้อยละ 95.89 ตามลำดับ ดังนั้นค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิตเดิล ซีรีบรัล จึงน่าจะมีบทบาทในการวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้ ในทางกลับกันค่าดอปเพลอร์ดังกล่าวยังน่าจะสามารถคัดทารกในครรภ์ที่ไม่เป็นโรคธาลัสซีเมีย

ชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทออกจากทารกที่เป็นโรคได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น ทารกที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท แต่วัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลได้ปกติ จะเป็นทารกที่เหมาะสมกับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยวิธีที่ไม่รุกราน เช่น การตรวจติดตามด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะ เพื่อค้นหาการบวมน้ำซึ่งเป็นอาการแสดงของโรคแทนที่จะต้องเสี่ยงกับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยวิธีการเจาะเลือดสายสะดือซึ่งมีความเสี่ยงต่อการแท้งมากกว่า เป็นต้น นอกจากนี้การตรวจติดตามค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล เป็นระยะน่าจะมีประโยชน์ในการค้นหาทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ก่อนที่ทารกจะแสดงอาการบวมน้ำ คล้ายกับการใช้ประโยชน์ดังกล่าวของค่าดอปเพลอร์ในกรณีทารกมีภาวะ Rh-isoimmunization ดังที่รายงานในหลายๆการศึกษาด้วย[23, 24]

อย่างไรก็ตามมีทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท 3 รายที่ค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล ปกติ แต่เมื่อสังเกตค่าดอปเพลอร์ที่วัดได้ของทารกทั้ง 3 รายนี้จะพบว่ามีย่านที่อยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับค่าจุดตัดที่ 1.5 MoM มาก ซึ่งแม้ว่าในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัลสูงผิดปกติเมื่อมีค่าเกินจุดตัดที่ 1.5 MoM ของแต่ละอายุครรภ์[1, 25] แต่ข้อมูลเหล่านี้ได้มาจากการศึกษาในทารกที่มีภาวะซีดจากโรค isoimmunization ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ค่าจุดตัดที่เหมาะสมสำหรับการค้นหาภาวะทารกในครรภ์ที่ซีดจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทนั้นอาจต่ำกว่า 1.5 MoM แต่จากการศึกษานี้ยังมีขนาดตัวอย่างที่ไม่มากพอในการหาค่าจุดตัดของดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัลที่เหมาะสม ดังนั้นในอนาคตจึงต้องการการศึกษาที่มีขนาดตัวอย่างมากพอ จึงจะสามารถหาค่าจุดตัดที่เหมาะสมในการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้ นอกจากนี้การตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงของทารกทั้ง 3 รายดังกล่าวพบว่าเริ่มมีอาการแสดงของหัวใจโต คือมีขนาดความกว้างของหัวใจต่อความกว้างของทรวงอก (Cardiothoracic Ratio : C/T ratio) มากกว่าร้อยละ 50 แล้ว ดังนั้นถ้านำค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลมาใช้ร่วมกับค่า C/T ratio น่าจะสามารถเพิ่มความไวในการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้มากขึ้น

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจากผลการศึกษาที่พบว่าค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัลมีความแม่นยำค่อนข้างสูงในการจำแนกทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท แต่แพทย์ทั้ง 8 ท่านผู้ตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงและวัดค่าดอปเพลอร์ ล้วนเป็นแพทย์ผู้มีความเชี่ยวชาญและมีประสบการณ์สูงในการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง ดังนั้นถ้าการวัดค่าดอปเพลอร์ดังกล่าว กระทำโดยแพทย์ผู้มีความชำนาญไม่มากนักอาจทำให้ความแม่นยำลดลงได้ ดังนั้นค่าความไวและความจำเพาะที่ได้จากการศึกษานี้อาจเกิดจากอคติได้บ้างและอาจไม่สามารถเป็นตัวแทนของความเป็นจริงในทางปฏิบัติได้ นอกจากนี้การวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลนั้น อาจคลาดเคลื่อนจากอคติของผู้ทำการวัดได้ เช่นในกรณีที่ทารกมีอาการแสดงของการบวมน้ำจากโรคเลือดธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท เช่น ขนาดหัวใจโต (Cardiomegaly), มีน้ำในช่องหุ้มหัวใจ (Pericardial effusion), มีปริมาณน้ำคร่ำมาก (Polyhydramnios) หรือมีน้ำในช่องท้อง (Ascites) เนื่องจากผู้วัดค่าดอปเพลอร์ได้พบลักษณะของ

ทารกในครรภ์จากการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงแล้วก่อนหน้าที่จะทำการวัดค่าดอปเพลร์ในทารกกรณีดังกล่าว

ข้อจำกัดอีกประการของการศึกษานี้คือไม่ได้มีการทดสอบความแปรปรวนของการวัดค่าดอปเพลร์ในแพทย์แต่ละท่านแม้ว่าจะได้รับการเตรียมการวัดค่าดอปเพลร์ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันแล้ว ในทางกลับกันจุดเด่นของการศึกษานี้คือ ขนาดตัวอย่างที่เพียงพอของทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท และการใช้จุดตัดของค่าดอปเพลร์เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัล ที่เปรียบเทียบกับค่าปกติของทารกในแต่ละอายุครรภ์ ซึ่งเป็นค่าปกติที่ได้จากการศึกษาในกลุ่มทารกที่เป็นประชากรไทยในโรงพยาบาลเดียวกันกับที่ทำการศึกษานี้[2] นอกจากนี้การวัดค่าดอปเพลร์ในการศึกษานี้ไม่ได้รับกวนขั้นตอนปกติของการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงของสตรีตั้งครรภ์ เนื่องจากการวัดค่าดอปเพลร์เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัล สามารถทำได้โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านเวชศาสตร์มารดาและทารกในครรภ์ได้ในหน่วยงาน และทุกรายสามารถวัดค่าดอปเพลร์ได้ครบถ้วนภายในเวลา 30 นาที จากนั้นทารกในครรภ์จะได้รับการเจาะเลือดสายสะดือทันทีหลังจากได้รับการตรวจวัดค่าดอปเพลร์แล้ว ดังนั้นกระบวนการของการศึกษานี้ทั้งหมดสามารถเกิดได้จริงในเวชปฏิบัติจริงในโรงพยาบาลและนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้โดยง่าย นอกจากนี้ทารกในครรภ์ทุกรายที่เข้าสู่วิจัยการศึกษานี้ที่ไม่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทไม่พบว่ามีรายใดที่มีค่าดอปเพลร์ของเส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัลที่สูงผิดปกติเลย ดังนั้นทารกที่มีค่าดอปเพลร์ดังกล่าวปกติจึงมีความเป็นไปได้น้อยมากที่จะเป็นโรคอย่างไรก็ตามทารกที่เป็นโรคอาจมีบางรายที่ค่าดอปเพลร์ปกติได้

การตรวจพบค่าดอปเพลร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัลที่ปกติในทารกที่มีความเสี่ยงของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์มีความสำคัญในการยืนยันความปกติของทารก ซึ่งทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการทำหัตถการวินิจฉัยก่อนคลอดชนิดรุกรานได้ เช่นใช้วิธีในการตรวจติดตามหาอาการแสดงของการบวมน้ำจากคลื่นเสียงความถี่สูง ซึ่งจะทำให้ลดความเสี่ยงและภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นกับทารกที่ต้องได้รับการเจาะเลือดสายสะดือโดยไม่จำเป็นลงได้ และเลือกเจาะเลือดสายสะดือในทารกบางรายที่มีค่าดอปเพลร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล สูงผิดปกติเท่านั้น ซึ่งการกระทำดังกล่าวนอกจากลดอัตราการสูญเสียทารกจากการเจาะเลือดสายสะดือแล้วยังสามารถลดค่าใช้จ่ายโดยรวมได้อีกด้วย

ด้วยเหตุผลดังกล่าว การเจาะเลือดสายสะดือหรือการตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ (DNA analysis) ควรเลือกทำเฉพาะในทารกที่ตรวจพบอาการแสดงของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทเท่านั้น นอกจากนี้การวัดค่าดอปเพลร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัลจะมีคุณค่ามากในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทมากและมีข้อจำกัดในการเจาะเลือดสายสะดือหรือการตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ ถึงแม้ว่ามีทารกที่เป็นโรคบางรายที่อาจตรวจไม่พบจากการวัดค่าดอปเพลร์ดังกล่าว แต่การตรวจจากคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อติดตามอาการแสดงของการบวมน้ำจะทำให้สามารถวินิจฉัยโรคในทารกกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้เนื่องจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท เป็นโรคที่มีความรุนแรงมาก และทารกไม่สามารถรอดชีวิตได้ ดังนั้นการยุติการตั้งครรภ์สามารถทำได้ในทุกอายุครรภ์เมื่อทารกในครรภ์ได้รับการ

วินิจฉัยว่าเป็นโรค จึงทำให้การตรวจไม่พบทารกที่เป็นโรคจากการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัลในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์แต่สามารถตรวจพบได้ภายหลังจากคลื่นเสียง ความถี่สูงจึงไม่ก่อให้เกิดผลเสียมากนัก อย่างไรก็ตามแม้ว่าการวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดงมิตเดิล ซีรีบรัล จะมีความแม่นยำค่อนข้างสูง แต่การวินิจฉัยทารกในครรภ์ว่าเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทหรือไม่ จำเป็นต้องใช้การทดสอบเพื่อยืนยันอีกครั้งหนึ่ง เช่นการตรวจเลือดทารกในครรภ์ เพื่อเป็นการตัดปัญหาเรื่องผลบวกของค่าดอปเพลอร์ดังกล่าว และอาจมีบางกรณีที่สาเหตุการบวมน้ำของทารกในครรภ์เกิดจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่โรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทก็เป็นได้

โดยสรุปแล้วถ้าผลการวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล ของทารกในครรภ์สตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทได้ผลปกตินั้นพบว่าโอกาสที่ทารกในครรภ์จะเป็นโรคมีน้อยมาก ในปัจจุบันเมื่อสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงและได้รับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดนั้น พบว่าโอกาสที่ทารกเป็นโรคเท่ากับร้อยละ 25 แต่โอกาสที่ทารกในครรภ์ไม่เป็นโรคแต่ต้องเสี่ยงต่อภาวะแทรกซ้อนของการวินิจฉัยก่อนคลอดโดยไม่จำเป็นจะเป็นจำนวนถึงร้อยละ 75 ดังนั้นการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัลซึ่งสามารถจำแนกทารกที่เป็นโรคออกจากทารกปกติ จึงสามารถลดการเจาะสายสะดือโดยไม่จำเป็นในทารกกลุ่มที่ไปน่าจะเป็นโรคได้ จากผลการศึกษาที่จึงสามารถนำมาเปลี่ยนแนวทางในการดูแลสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงได้ โดยเฉพาะการนำการวัดค่าดอปเพลอร์มาเป็นส่วนหนึ่งของการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อค้นหาความผิดปกติกำเนิดของทารกในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทสูง ดังนั้นจากผล การศึกษานี้ได้ค้นพบอาการแสดงของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทที่สามารถตรวจพบได้จากการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงในช่วงกึ่งกลางของการตั้งครรภ์ แต่ในอนาคตควรมี การศึกษาที่มุ่งเน้นถึงการแสดงของโรคที่สามารถตรวจได้จากคลื่นเสียงความถี่สูงได้ตั้งแต่ ช่วงไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ เช่นขนาดของหัวใจจากการวัดค่า C/T ratio ที่มีการกล่าวถึง ในการศึกษาที่ผ่านมาด้วย

แนวทางปฏิบัติของประเทศไทยในปัจจุบันในเรื่องของการวินิจฉัยก่อนคลอดของ โรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทนั้นเป็นการเจาะเลือดสายสะดือทารกเมื่ออายุครรภ์ 18-21 สัปดาห์ ซึ่งการวินิจฉัยก่อนคลอดวิธีนี้สามารถทำได้เฉพาะในโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเท่านั้น ดังนั้นในระดับโรงพยาบาลชุมชนควรมีการคัดกรองส่งต่อผู้ป่วยมารับการเจาะเลือดสายสะดือ เฉพาะกรณีที่ทารกในครรภ์มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคดังกล่าวเท่านั้น ดังนั้นการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัลจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบริหารจัดการเพื่อพิจารณาว่า สตรีตั้งครรภ์รายใดที่สมควรได้รับการส่งต่อไปยังโรงพยาบาลระดับตติยภูมิเพื่อทำการวินิจฉัย ก่อนคลอด หรือสตรีตั้งครรภ์รายใดที่สมควรตรวจติดตามอาการบวมน้ำจากการตรวจคลื่นเสียง ความถี่สูงเป็นระยะ ซึ่งสามารถทำได้ในโรงพยาบาลชุมชนเอง ซึ่งด้วยวิธีการบริหารจัดการ ดังกล่าวจะทำให้จำนวนการเสียชีวิตของทารกที่เกิดจากภาวะแทรกซ้อนของการเจาะเลือดสายสะดือโดยไม่จำเป็น และค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ลดลงด้วย

ถึงแม้ว่ามีทารกที่เป็นโรคบางรายที่ไม่สามารถจำแนกได้จากการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล แต่ทารกเหล่านี้สามารถตรวจพบได้จากการตรวจติดตามคลื่นเสียงความถี่สูงในภายหลัง และการตรวจพบว่าทารกเป็นโรคในเวลาต่อมาไม่ได้ส่งผลเสียใดๆต่อผลลัพธ์การตั้งครรภ์โดยรวมมากนัก เนื่องจากโรคชนิดนี้เป็นโรคที่มีความรุนแรงถึงแก่ชีวิต ไม่มีวิธีการรักษา จึงต้องสิ้นสุดด้วยการยุติการตั้งครรภ์อยู่ดี และแม้ว่าการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล จะมีความแม่นยำค่อนข้างสูงในการจำแนกทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท แต่วิธีนี้ยังไม่ใช่วินิจฉัยโรค ดังนั้นการวินิจฉัยขั้นสุดท้ายด้วยการตรวจเลือดทารกในครรภ์นั้นมีความจำเป็น เพื่อเป็นการป้องกันผลบวกลวงที่อาจเกิดขึ้นได้ และเป็นการตัดสาเหตุของการบวมน้ำที่เกิดจากสาเหตุอื่นๆที่ไม่ใช่โรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ด้วย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. เนื่องจากประสิทธิภาพของการวัดค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิตเดิล ซีรีบรัล จากการศึกษานี้ยังมีผลบวกลวงอยู่บ้าง คือมีทารกในครรภ์ที่เป็นโรคอยู่จำนวนเล็กน้อยที่จำแนกไม่ได้ด้วยค่าดอปเพลอร์ดังกล่าว แต่พบว่าถ้านำค่าดอปเพลอร์มาประยุกต์ใช้ร่วมกับลักษณะทางคลื่นเสียงความถี่สูงอื่นๆ เช่น ขนาดของหัวใจทารกเทียบกับขนาดทรวงอก (Cardiothoracic Ratio : C/T ratio) น่าจะลดปัญหาดังกล่าวได้ ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตควรเกี่ยวข้องกับการคิดระบบในการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทออกจากทารกปกติ โดยใช้ข้อมูลจากหลายๆระบบมาประกอบกัน โดยอาจคิดเป็นระบบการให้คะแนน (Scoring system) ก็ได้
2. การศึกษานี้เป็นการศึกษาในช่วงกึ่งกลางการตั้งครรภ์ (mid pregnancy) คือในช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ แต่การวิจัยในอนาคตอาจมุ่งเน้นไปที่การศึกษาในช่วงอายุครรภ์ในไตรมาสแรก (11-14 สัปดาห์) เพื่อการจำแนกทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ออกจากทารกปกติได้เร็วขึ้น

Keywords : Homozygous alpha thalassemia-1, Middle Cerebral Artery – peak systolic velocity (MCA-PSV)

เนื้อหางานวิจัยส่วนที่ 2

ชื่อเรื่อง: การเปรียบเทียบค่าต่างๆของดัชนีเม็ดเลือดแดงในช่วงกึ่งกลางการตั้งครรภ์ระหว่างกลุ่มทารกในครรภ์ที่ปกติ, ทารกที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียสายอัลฟา 1 และทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดงในช่วงกึ่งกลางการตั้งครรภ์ระหว่างทารกในครรภ์ที่ปกติ, ทารกที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียสายอัลฟา 1 และทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท

วิธีทดลอง

ผู้ที่เข้ารับการศึกษาคือสตรีตั้งครรภ์ทั้งหมด 88 ราย (ซึ่งคิดเป็นทารกในครรภ์ 89 ราย) ซึ่งเป็นคู่เสี่ยงต่อการมีทารกเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท และรับการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดโดยวิธีเจาะเลือดสายสะดือที่อายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ ที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2551

การเจาะเลือดสายสะดือทารกกระทำโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาเวชศาสตร์มารดาและทารกทั้งหมด 8 คน โดยใช้เครื่องตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงชนิด Aloka Prosound 5000 หรือ Aloka SSD alpha-10 (Tokyo, Japan) โดยใช้หัวตรวจทางหน้าท้องชนิด curvilinear 3.5 MHz และในขณะที่เจาะเลือดสายสะดือจะทำการเก็บเลือดทารกในครรภ์เพิ่มเติมอีกประมาณ 0.5 ถึง 1 มิลลิลิตรเพื่อนำมาตรวจหาค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดงได้แก่ ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hemoglobin (Hb) level), ค่า MCV (Mean Corpuscular Volume), ค่า MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), ค่า MCHC (Mean Cell Hemoglobin Concentration) รวมทั้งวัดระดับความรุนแรงของภาวะซีดของทารกในครรภ์ โดยทำการตรวจค่าดัชนีทั้งหมดด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือด (Automated Complete Blood Count (CBC) machine) ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเลือดจากการเจาะเลือดสายสะดือทารก ในส่วนของการวัดระดับความรุนแรงของภาวะซีดของทารกในครรภ์ จะเปรียบเทียบกับค่าระดับฮีโมโกลบินของทารกปกติที่อายุครรภ์ต่างๆ[3]

การตรวจว่าทารกในครรภ์เกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา ว่าทารกในครรภ์เป็นโรคบาร์ท (Hemoglobin Bart's disease), เป็นพาหะชนิดอัลฟา (Alpha-thalassemia-1 trait) หรือเป็นทารกปกตินั้น จะใช้วิธีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA analysis) โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยจะทำ PCR เฉพาะความผิดปกติชนิด South East Asian (SEA type deletion) โดยลำดับเบสที่ใช้เป็น primer ในการทำ PCR มี 3 ตำแหน่งดังนี้

- จุดเริ่มต้น (forward) S1: 5'-CTG GGC TCT GTG TTC TCA G-3'
- จีนปกติ (normal allele reverse) S2: 5'-GAC ACG CTT CCA ATA CGC-3'
- จีนผิดปกติ (mutant allele reverse) S3: 5'-TAC TGC AGC CTT GAA CTC C-3'

จากผลการตรวจในระดับดีเอ็นเอ จึงทำการจำแนกทารกในครรภ์เป็น 3 กลุ่ม คือทารกปกติ, ทารกที่เป็นพาหะโรคธาลัสซีเมียสายอัลฟ่า 1 และทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท

ผลการทดลอง

จากสตรีตั้งครรภ์ทั้งหมด 88 ราย (คิดเป็นทารกในครรภ์ทั้งสิ้น 89 ราย) ที่เข้าสู่วัยการศึกษานั้น อายุครรภ์โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 18.7 ± 0.8 สัปดาห์ และมีทารก 1 รายที่ต้องตัดออกจากครรภ์เนื่องจากมีภาวะซีดรุนแรงจากโรคธาลัสซีเมียชนิด Hemoglobin H / Constant Spring ดังนั้นจึงเหลือทารกที่เข้าสู่วัยการศึกษารวมทั้งสิ้น 88 ราย ซึ่งพบว่าอุบัติการณ์ของโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท, ทารกที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียสายอัลฟ่า 1 และทารกปกติเป็นร้อยละ 29.5 (26 ราย), ร้อยละ 45.5 (40 ราย) และร้อยละ 25 (22 ราย)ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดง ได้แก่ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน, ค่า MCV, MCH และ MCHC ของทารกทั้ง 3 กลุ่มดังที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งพบว่าค่าดัชนีทั้งหมดนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างทารกทั้ง 3 กลุ่ม (P-value < 0.001)

ตารางที่ 1: แสดงค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์ช่วงอายุถึงกลางการตั้งครรภ์ (ใช้สถิติ ANOVA test)

Red blood cell parameters	Fetuses (88 cases)			P- value
	Normal (22 cases)	Alpha-1 trait (40 cases)	Hb Bart's disease (26 cases)	
Hb level (gm/dl)	11.34 ± 0.83	10.42 ± 0.91	6.4 ± 1.64	< 0.001
MCV (fl)	123.40 ± 7.76	105.95 ± 7.35	96.26 ± 8.19	< 0.001
MCH (pg)	41.39 ± 3.35	33.71 ± 2.74	26.23 ± 2.6	< 0.001
MCHC (g/L)	33.44 ± 1.3	31.81 ± 1.09	27.29 ± 1.78	< 0.001

ในส่วนของความรุนแรงของภาวะซีดของทารกในครรภ์ทั้ง 3 กลุ่ม แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าในกลุ่มทารกที่ปกติ ไม่มีทารกรายใดเลยที่มีภาวะซีด ในขณะที่ร้อยละ 92.3 (คิดเป็นทารกจำนวน 24 จาก 26 ราย) ของทารกในกลุ่มที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทมีภาวะซีดเกิดขึ้นแล้ว นอกจากนี้พบว่ามีทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท 2 รายที่ไม่มีภาวะซีด และมีค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดง มิดเดิล ซีรีบรัล (Middle Cerebral Artery – peak systolic velocity; MCA-PSV) ปกติ แต่ทารกทั้ง 2 รายมีอาการแสดงของขนาดหัวใจโต ซึ่งเป็นอาการของภาวะบวมน้ำ (Hydrops fetalis) เกิดขึ้นแล้ว

ตารางที่ 2: แสดงระดับความรุนแรงของภาวะซีดของทารกในครรภ์ทั้ง 3 กลุ่ม

Severity of anemia*	Fetuses (Total 88 cases)		
	Normal Cases (%)	Alpha-1 trait Cases (%)	Hb Bart's disease Cases (%)
No anemia	22 (100)	38 (95)	2 (7.7)
Mild anemia	0	2 (5)	6 (23.1)
Moderate anemia	0	0	11 (42.3)
Severe anemia	0	0	7 (26.9)
Total (cases)	22	40	26

* Severity of anemia in each fetus is defined from nomogram of hemoglobin level of fetus in each gestational age.[3]

จากผลการศึกษาพบว่า ร้อยละ 95 (38 รายจาก 40 ราย) ของทารกที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟ่า 1 ไม่มีภาวะซีด แม้ว่าค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินจะต่ำกว่าทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามมีทารกในกลุ่มนี้ 2 รายที่มีภาวะซีดเล็กน้อย แต่จากการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงไม่พบว่าทารกทั้ง 2 รายมีอาการแสดงใดๆของภาวะบวมน้ำ ทารก 1 ใน 2 รายดังกล่าวได้คลอดด้วยวิธีผ่าตัดคลอดทางหน้าท้องที่โรงพยาบาลอื่น น้ำหนักแรกคลอด 2300 กรัมและมีสุขภาพแข็งแรงดี แต่ทารกอีก 1 รายที่เหลือยังไม่คลอดจนถึงปัจจุบัน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟ่าเป็นหนึ่งในปัญหาทางโลหิตวิทยาที่พบได้บ่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ความถี่ของจีนธาลัสซีเมียชนิดอัลฟ่า 1 ในภาคเหนือของประเทศไทยประมาณร้อยละ 10[26] ซึ่งในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยได้ใช้มาตรการของ Chiang Mai strategy ในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในทารกแรกเกิด เพื่อทำการค้นหาสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยง[27] ซึ่งในแนวปฏิบัติปัจจุบันจะทำการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดด้วยการเจาะเลือดสายสะดือทารก (Cordocentesis) และส่งตรวจชนิดของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin typing) ด้วยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟ่า 1 ออกจากทารกปกติยังไม่ดีนักด้วยวิธีการตรวจแบบ HPLC นี้ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้การวินิจฉัยว่าทารกเป็นโรค หรือเป็นพาหะ หรือปกติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ (DNA analysis) โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย และเนื่องจากความผิดปกติในกลุ่มที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟ่า 1 ที่พบได้มากที่สุดภูมิภาคนี้คือ South East Asia (SEA) type deletion ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำ PCR เพื่อค้นหาเฉพาะ SEA type

deletion เท่านั้น นอกจากนี้ในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการตรวจหาภาวะพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 2 (Alpha-thalassemia-2 deletion) เนื่องจากผู้ป่วยที่เป็นพาหะชนิดนี้จะไม่มีอาการใดๆทางคลินิก และไม่มี ความแตกต่างจากประชากรปกติที่ไม่เป็นพาหะแต่อย่างใด และยังไม่มีความจำเป็นต้องทำการวินิจฉัยก่อนคลอดในกรณีที่สตรีตั้งครรภ์หรือสามีเป็นพาหะชนิดอัลฟา 2 อีกด้วย สรุปแล้วในการศึกษานี้ทารกในครรภ์ทุกรายของสตรีที่เป็นคู่เสี่ยงจะได้รับ การจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ทารกปกติ ทารกที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 (Heterozygous alpha-thalassemia-1 or Alpha-thalassemia-1 trait) และทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท (Homozygous alpha-thalassemia-1 or Hb Bart's disease)

จากผลการศึกษาพบว่าระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินและค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดง (MCV, MCH, MCHC) ของทารกในครรภ์ในช่วงอายุกึ่งกลางการตั้งครรภ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างทารกทั้ง 3 กลุ่มดังกล่าว ($P\text{-value} < 0.001$) ซึ่งอาจอธิบายได้จากพยาธิสรีรวิทยาของโรคซึ่งเกี่ยวกับปริมาณสายอัลฟาโกลบินที่ลดลงหรือไม่เลย จึงทำให้ทารกมีอาการซีดตั้งแต่ขณะอยู่ในครรภ์ ดังนั้นค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นฮีโมโกลบินและดัชนีเม็ดเลือดแดงในกลุ่มทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทจะต่ำกว่าทารกอีก 2 กลุ่มที่ปกติหรือเป็นเพียงพาหะของโรคอย่างชัดเจน (ค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นฮีโมโกลบินเท่ากับ 6.4 gm/dl)

อย่างไรก็ตามข้อมูลที่น่าสนใจที่ได้จากการศึกษานี้คือ ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงทุกค่า (MCV, MCH, MCHC) ของทารกกลุ่มที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 จะต่ำกว่ากลุ่มทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้เช่นเดียวกับผู้ใหญ่ที่เป็นพาหะของโรคถึงแม้ว่าค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์อาจจะแตกต่างกับค่าในผู้ใหญ่อยู่บ้าง ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวน่าจะเกิดประโยชน์ในกรณีของการนำค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงจากเลือดจากสายสะดือทารกแรกคลอดไปใช้เพื่อเป็นการตรวจคัดกรองหาพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 สำหรับประชากรที่เกิดใหม่ทุกคนในอนาคตได้ นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นฮีโมโกลบินของทารกในครรภ์กลุ่มที่เป็นพาหะจะต่ำกว่ากลุ่มทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P\text{-value} < 0.001$) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วผู้ที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 จะไม่ซีดและไม่มีความจำเป็นต้องได้รับการตรวจวินิจฉัย อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษานี้ได้จุดประกายเกี่ยวกับพยาธิสภาพของกลุ่มพาหะดังกล่าว กล่าวคือถึงแม้ว่าความรู้เดิมในอดีตจะเชื่อว่าภาวะที่เป็นเพียงพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 นั้นจะไม่มีผลกระทบใดๆต่อร่างกาย เนื่องจากร่างกายสามารถปรับตัวทดแทนสายอัลฟาโกลบินที่มีจำนวนลดลงได้ จึงทำให้ผู้ที่เป็นพาหะจะไม่มีอาการใดๆ และไม่แตกต่างกับคนปกติ แต่จากการศึกษานี้แสดงว่าแท้จริงแล้วการปรับตัวหรือทดแทนในระดับจีนของร่างกายอาจทำได้ไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ตรวจพบระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินลดลงได้ตั้งแต่วัยอยู่ในครรภ์

ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือไม่ได้มีการตรวจหาความผิดปกติชนิดอื่นๆทั้งหมดของจีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสายโกลบิน ซึ่งอาจทำให้มีทารกบางรายที่มีความผิดปกติดังกล่าวปะปนอยู่

ในกลุ่มทารกที่เป็นพาหะได้ อย่างไรก็ตามตัวทวนนี้ไม่น่าจะมีผลกระทบมากนักต่อผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับทารกกลุ่มปกติ เนื่องจากถ้ามีความผิดปกติชนิดอื่นๆของจีนเกิดขึ้นจริงน่าจะมีการกระจายที่อยู่ในระดับเท่าๆกันระหว่างทารกทั้งกลุ่มปกติและกลุ่มทารกที่เป็นพาหะ

สำหรับทารกในกลุ่มที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้น พบว่าร้อยละ 93 ของทารกกลุ่มนี้มีภาวะซีดเกิดขึ้นแล้วตั้งแต่วัยทารกถึงกลางการตั้งครรภ์ แต่ระดับความรุนแรงของภาวะซีดแตกต่างกันและคาดเดาได้ค่อนข้างยาก อย่างไรก็ตามเกือบครึ่งหนึ่งของทารกกลุ่มนี้ (ร้อยละ 42) มีภาวะซีดในระดับปานกลาง (moderate degree of anemia) ส่วนภาวะซีดรุนแรงพบได้ประมาณร้อยละ 27 ของทารกกลุ่มนี้ ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้นส่วนใหญ่จะเกิดภาวะซีดตั้งแต่วัยทารกถึงกลางการตั้งครรภ์ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคจึงควรจะได้เกือบทั้งหมดภายในช่วงอายุครรภ์นี้

นอกจากนี้พบว่ามีการ 2 รายที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้นที่ไม่ซีดและมีค่าดอปเพลอร์เส้นเลือดแดงมิดเดิล ซีรีบรัล (Middle Cerebral Artery-Peak Systolic Velocity; MCA-PSV) ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าไม่มีภาวะซีดเกิดขึ้นจริง แต่ทารกทั้ง 2 รายนี้มีขนาดของหัวใจโต ซึ่งเป็นอาการแสดงของการที่หัวใจต้องทำงานหนักและเป็นอาการเริ่มแรกของภาวะบวมน้ำ (Hydrops fetalis) จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงก่อให้เกิดสมมติฐานเกี่ยวกับพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดภาวะบวมน้ำว่า นอกจากปริมาณ (quantity) ของฮีโมโกลบินที่ต่ำผิดปกติแล้ว คุณภาพ (quality) ของฮีโมโกลบินน่าจะมีความสำคัญต่อการเกิดโรคด้วย กล่าวคือทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้นจะไม่สามารถได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอได้ เนื่องจากในร่างกายมีฮีโมโกลบินชนิดบาร์ทั้นเพียงอย่างเดียวซึ่งไม่สามารถส่งออกซิเจนไปยังอวัยวะต่างๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลว (High output cardiac failure) ดังที่พบในทารกทั้ง 2 รายที่ไม่ได้พบว่ามีภาวะซีดแต่อย่างใดดังที่ได้กล่าวแล้ว ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าพยาธิสรีรวิทยาของภาวะซีดจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้นแตกต่างจากพยาธิสรีรวิทยาในกรณีของทารกที่เกิดภาวะซีดจากสาเหตุ Rh-isoinmunization เนื่องจากทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้นอาจไม่ได้มีระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่ำเสมอไปเหมือนกับในทารกที่มีภาวะ Rh-isoinmunization

ในทางกลับกันทารกกลุ่มที่เป็นพาหะของโรคเกือบทุกรายไม่มีภาวะซีด (แม้ว่ามีทารกประมาณ 2 รายเท่านั้นที่มีภาวะซีดเล็กน้อย) อย่างไรก็ตามทารกในกลุ่มที่เป็นพาหะนี้มีระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่ำกว่าทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามทารกที่เป็นพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 นี้จะไม่เกิดภาวะบวมน้ำแต่อย่างใด ซึ่งต่างจากทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทั้นหรือทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินเอช (Hemoglobin H disease) [28, 29]

ข้อได้เปรียบของการศึกษานี้คือมีจำนวนขนาดตัวอย่างที่เพียงพอ และผลการศึกษามีความน่าเชื่อถือสูงเนื่องจากใช้การวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอในการวินิจฉัยขั้นสุดท้าย นอกจากนี้การตรวจค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงจะทำภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือดสายสะดือซึ่งทำให้ค่าที่ได้มีความถูกต้องสูง นอกจากนี้การศึกษานี้ยังเป็นการจุดประกายเกี่ยวกับการแสดงออก

(Phenotypic expression) ของจีนอัลฟาธาลัสซีเมีย 1 และพยาธิสรีรวิทยาของภาวะบวมน้ำจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท และค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดงในทารกกลุ่มปกติ, ทารกกุ่มพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 และทารกกลุ่มเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นค่ามาตรฐานสำหรับการศึกษาต่างๆในอนาคตและนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ และแม้ว่าจะมีการศึกษาที่เกี่ยวกับการใช้ปริมาณของฮีโมโกลบินบาร์ทในเลือดสายสะดือทารกแรกเกิดในการคัดกรองโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 ในประชากรทั่วไป[30-33] อย่างไรก็ตามถ้าใช้การตรวจคัดกรองดังกล่าวด้วยเครื่องมือที่ใช้นับเม็ดเลือด (Automated complete blood count (CBC) machine) เพื่อวัดค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดงจะทำได้ง่ายกว่าการวัดปริมาณฮีโมโกลบินบาร์ทมากอีกด้วย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. จากผลการศึกษานี้สามารถพัฒนาหรือต่อยอดได้โดยการนำค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดงมาใช้คัดกรองพาหะของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 จากเลือดสายสะดือของทารกแรกเกิดทุกราย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพื่อหาค่ามาตรฐานของดัชนีเม็ดเลือดแดงของทารกแรกเกิดในกลุ่มต่างๆ ทั้งทารกปกติ, ทารกที่เป็นพาหะโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 และทารกที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทในกลุ่มประชากรไทย เพื่อนำมาหาค่าจุดตัดที่เหมาะสมของดัชนีเม็ดเลือดแดง ก่อนจะมาใช้เป็นการตรวจคัดกรองในวงกว้างต่อไป
2. เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงพยาธิสรีรวิทยาในการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทของทารกในครรภ์อย่างชัดเจน ซึ่งจากผลการศึกษานี้พบว่าทารกในกลุ่มนี้อาจมีพยาธิสรีรวิทยา, พยาธิกำเนิด หรือธรรมชาติของโรคที่แตกต่างไปจากทารกที่ซิดจากภาวะ Rh-isoimmunization (ซึ่งมีการศึกษาค่อนข้างมากแล้ว) และเนื่องจากปัญหาโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทเป็นปัญหาหลักของประเทศไทยโดยตรง ดังนั้นถ้าในอนาคตมีการศึกษาเกี่ยวกับธรรมชาติของโรคนี้ จะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจที่กระจ่างขึ้น และนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ต่อไป

Keywords : Alpha-thalassemia, Hematology, Mid pregnancy

เอกสารอ้างอิง

- [1] Mari G. Middle cerebral artery peak systolic velocity for the diagnosis of fetal anemia: the untold story. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005 Apr;25(4):323-30.
- [2] Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K. Middle cerebral artery peak systolic velocity of healthy fetuses in the first half of pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2007 Aug;26(8):1013-7.

- [3] Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, Jr., et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *The New England journal of medicine*. 2000 Jan 6;342(1):9-14.
- [4] Chan LW, Lau TK, Chung TK. Fetal anaemia as a cause of fetal injury: diagnosis and management. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2006 Apr;18(2):100-5.
- [5] Ahmed B, Ghaffari Z, Ismail RS, Saleh N. Non-invasive diagnosis of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Saudi medical journal*. 2005 Feb;26(2):256-9.
- [6] Alshimiri MM, Hamoud MS, Al-Saleh EA, Mujaibel KY, Al-Harmi JA, Thalib L. Prediction of fetal anemia by middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus isoimmunization. *J Perinatol*. 2003 Oct;23(7):536-40.
- [7] Bullock R, Martin WL, Coomarasamy A, Kilby MD. Prediction of fetal anemia in pregnancies with red-cell alloimmunization: comparison of middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid OD450. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005 Apr;25(4):331-4.
- [8] Cosmi E, Mari G, Delle Chiaie L, Detti L, Akiyama M, Murphy J, et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia resulting from parvovirus infection. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2002 Nov;187(5):1290-3.
- [9] Delle Chiaie L, Buck G, Grab D, Terinde R. Prediction of fetal anemia with Doppler measurement of the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by maternal blood group alloimmunization or parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Sep;18(3):232-6.
- [10] Escribano D, Galindo A, Arbues J, Puente JM, De la Fuente P. Prenatal management of placental chorioangioma: value of the middle cerebral artery peak systolic velocity. *Fetal diagnosis and therapy*. 2006;21(6):489-93.
- [11] Hernandez-Andrade E, Scheier M, Dezerega V, Carmo A, Nicolaides KH. Fetal middle cerebral artery peak systolic velocity in the investigation of non-immune hydrops. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2004 May;23(5):442-5.
- [12] Imbar T, Lev-Sagie A, Cohen S, Yanai N, Yagel S. Diagnosis, surveillance, and treatment of the anemic fetus using middle cerebral artery peak systolic velocity measurement. *Prenatal diagnosis*. 2006 Jan;26(1):45-51.
- [13] Kempe A, Rosing B, Berg C, Kamil D, Heep A, Gembruch U, et al. First-trimester treatment of fetal anemia secondary to parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007 Feb;29(2):226-8.
- [14] L'Ubusky M, Prochazka M, Santavy J, Mickova I, Machac S, Kantor L. [Contribution of Doppler examination in pregnancy at risk of alloimmune fetus anemia]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev*. 2005 Jan;70(1):27-9.

- [15] Mari G. Middle cerebral artery peak systolic velocity: is it the standard of care for the diagnosis of fetal anemia? *J Ultrasound Med.* 2005 May;24(5):697-702.
- [16] Pereira L, Jenkins TM, Berghella V. Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2003 Oct;189(4):1002-6.
- [17] Rimón E, Peltz R, Gamzu R, Yagel S, Feldman B, Chayen B, et al. Management of Kell isoimmunization--evaluation of a Doppler-guided approach. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006 Nov;28(6):814-20.
- [18] Lam YH, Tang MH. Middle cerebral artery Doppler study in fetuses with homozygous alpha-thalassaemia-1 at 12-13 weeks of gestation. *Prenatal diagnosis.* 2002 Jan;22(1):56-8.
- [19] Maguire K, Johnson A, Ou CN, Lantin RL, Moise KJ. Elevated middle cerebral artery peak systolic velocity without fetal anemia in a case of homozygous alpha-thalassemia-1. *Prenatal diagnosis.* 2008 Jan;28(1):72-4.
- [20] Dashe JS, Ramus RM, Santos-Ramos R, McIntire DD, Twickler DM. Middle cerebral artery peak systolic velocity in monochorionic and dichorionic twin pregnancies. *J Ultrasound Med.* 2007 Feb;26(2):195-200.
- [21] Lubusky M, Prochazka M, Santavy J, Mickova I, Kantor L. [Actual management of pregnancies at risk for fetal anemia]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev.* 2006 Jul;71(4):272-80.
- [22] Mari G, Abuhamad AZ, Cosmi E, Segata M, Altaye M, Akiyama M. Middle cerebral artery peak systolic velocity: technique and variability. *J Ultrasound Med.* 2005 Apr;24(4):425-30.
- [23] Detti L, Mari G, Akiyama M, Cosmi E, Moise KJ, Jr., Stefor T, et al. Longitudinal assessment of the middle cerebral artery peak systolic velocity in healthy fetuses and in fetuses at risk for anemia. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2002 Oct;187(4):937-9.
- [24] Mari G, Zimmermann R, Moise KJ, Jr., Deter RL. Correlation between middle cerebral artery peak systolic velocity and fetal hemoglobin after 2 previous intrauterine transfusions. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2005 Sep;193(3 Pt 2):1117-20.
- [25] Scheier M, Hernandez-Andrade E, Carmo A, Dezerega V, Nicolaides KH. Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 May;23(5):432-6.
- [26] Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1992 Dec;23(4):647-55.
- [27] Tongsong T, Wanapirak C, Sirivatanapa P, Sanguansermisri T, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, et al. Prenatal control of severe thalassaemia: Chiang Mai strategy. *Prenat Diagn.* 2000 Mar;20(3):229-34.

- [28] Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, Lafferty J, Patterson M, Eng B, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. *Br J Haematol*. 2001 Oct;115(1):72-8.
- [29] Li D, Liao C, Li J, Xie X, Huang Y, Wu Q. Hemoglobin H hydrops fetalis syndrome resulting from the association of the –SEA deletion and the aQuong Szea mutation in a Chinese woman. *Eur J Haematol*. 2005;75:259-61.
- [30] Lie-Injo LE, Solai A, Herrera AR, Nicolaisen L, Kan YW, Wan WP, et al. Hb Bart's level in cord blood and deletions of alpha-globin genes. *Blood*. 1982 Feb;59(2):370-6.
- [31] Zhao W, Zhang J, Wang NS, Deng P. The relationship between Hb Bart's levels in cord blood and the deletions of alpha-globin genes. *Hemoglobin*. 1988;12(5-6):519-27.
- [32] Kyriacou K, Kyrii A, Kalogirou E, Vasiliades P, Angastiniotis M, Ioannou PA, et al. Hb Bart's levels in cord blood and alpha-thalassemia mutations in Cyprus. *Hemoglobin*. 2000 Aug;24(3):171-80.
- [33] Rugless MJ, Fisher CA, Stephens AD, Amos RJ, Mohammed T, Old JM. Hb Bart's in cord blood: an accurate indicator of alpha-thalassemia. *Hemoglobin*. 2006;30(1):57-62.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานวิจัยส่วนที่ 1

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
อยู่ในระหว่างการ Submission ของวารสารวิชาการนานาชาติ ชื่อ Ultrasound in Obstetrics & Gynecology
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ : ไม่มี
 - เชิงนโยบาย : ไม่มี
 - เชิงสาธารณะ : ไม่มี
 - อื่นๆ: การนำเสนอผลงาน (Preliminary report) ในที่ประชุมวิชาการครั้งที่ 22 และการประชุมสามัญประจำปี 2550 ของราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย ที่อาคารเฉลิมพระบารมี ชอยศูนย์วิจัย กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 29 ตุลาคม ถึง 1 พฤศจิกายน 2550 รวมทั้งมีการตีพิมพ์บทความในเอกสารประกอบการประชุม ดังกล่าว (ดังเอกสารในภาคผนวก)

ผลงานวิจัยส่วนที่ 2

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
อยู่ในระหว่างการ Submission ของวารสารวิชาการนานาชาติ ชื่อ American Journal of Hematology
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ : ไม่มี
 - เชิงนโยบาย : ไม่มี
 - เชิงสาธารณะ : ไม่มี
 - อื่นๆ: ไม่มี

เอกสารสรุปผลงานวิจัยสำหรับการเผยแพร่ทั่วไป

ผลงานวิจัยส่วนที่ 1

ชื่อเรื่อง “การจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดบาร์ทออกจากทารกที่ไม่เป็นโรค โดยใช้การวัดค่าเส้นเลือดแดง มิติเดล ซีรีบรัล ในศีรษะทารก”

เนื่องจากโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทเป็นโรคที่ยังไม่มีวิธีรักษา ทำให้เกิดทารกเสียชีวิตจากอาการบวมน้ำ และยังเป็นอันตรายต่อสตรีตั้งครรภ์ด้วยถ้าวินิจฉัยได้ล่าช้า และในสตรีตั้งครรภ์ทั้งหมดที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคในทารก จะมีทารกเพียงร้อยละ 25 เท่านั้นที่เป็นโรคดังกล่าวจริง ๆ ส่วนทารกอีกร้อยละ 75 ของสตรีคู่เสี่ยงเหล่านี้เป็นทารกที่ไม่เป็นโรค

ในปัจจุบันการตรวจว่าทารกในครรภ์ของสตรีที่เป็นคู่เสี่ยงเป็นโรคหรือไม่จะทำการเจาะเลือดสายสะดือในสตรีคู่เสี่ยงทุกรายเมื่ออายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาบางประการเช่น เกิดการแท้งภายหลังการเจาะได้ ซึ่งเมื่อคำนวณแล้วพบว่ามียาทารกถึงร้อยละ 75 ที่ต้องได้รับความเสี่ยงจากการเจาะเลือดสายสะดือโดยไม่จำเป็น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาทารกในครรภ์ที่อยู่ในกลุ่มร้อยละ 25 ที่มีโอกาสเป็นโรคสูง และเจาะเลือดสายสะดือในทารกกลุ่มนี้เท่านั้น ส่วนทารกที่ถือว่าความเสี่ยงต่ำอาจไม่มีความจำเป็นต้องเจาะเลือดสายสะดือก็ได้

ในการศึกษานี้ จากการทดสอบในทารกในครรภ์ทั้งหมด 91 ราย พบว่าการวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดในศีรษะทารกในครรภ์ที่มีชื่อว่า มิติเดล ซีรีบรัล โดยใช้การตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์) สามารถจำแนกทารกในครรภ์ที่เป็นโรคออกจากทารกที่ไม่เป็นโรคได้ โดยพบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะที่ค่อนข้างสูง คือ ความไวร้อยละ 85 และความจำเพาะร้อยละ 100 โอกาสที่ค่าดอปเพลอร์ผิดปกติและทารกเป็นโรคเท่ากับร้อยละ 100 และโอกาสที่ค่าดอปเพลอร์ปกติและทารกไม่เป็นโรคเท่ากับร้อยละ 95.9 อย่างไรก็ตามการวัดค่าดอปเพลอร์ดังกล่าวไม่สามารถทดแทนการเจาะเลือดสายสะดือได้ เนื่องจากมีทารกที่เป็นโรคบาร์ทจำนวน 3 รายในการศึกษานี้ (จากทารกที่เป็นโรคทั้งหมด 20 ราย) ที่พบว่าค่าดอปเพลอร์ปกติ

โดยสรุปแล้ว การวัดค่าดอปเพลอร์ของเส้นเลือดแดง มิติเดล ซีรีบรัล ในศีรษะทารกในครรภ์ช่วงอายุ 18-22 สัปดาห์จะเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยจำแนกว่าทารกในครรภ์มีโอกาสเป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทมากน้อยเพียงใด และอาจคัดเลือกเฉพาะทารกกลุ่มที่มีค่าดอปเพลอร์ผิดปกติ (มีความเสี่ยงสูง) มาทำการเจาะเลือดสายสะดือทารกก็ได้ ส่วนทารกกลุ่มที่ค่าดอปเพลอร์ปกติอาจพิจารณาตรวจติดตามโดยวิธีที่ไม่อันตรายมากนัก เช่น การตรวจคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นระยะๆ เป็นต้น

ผลงานวิจัยส่วนที่ 2

ชื่อเรื่อง “การเปรียบเทียบค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดงระหว่างทารกในครรภ์ที่ปกติ, ทารกที่เป็นพาหะของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 และทารกที่เป็นโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท”

สำหรับสตรีตั้งครรภ์ที่เป็นคู่เสี่ยงต่อการเกิดโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ทของทารกในครรภ์นั้น เมื่อทำการตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดแล้วจะจำแนกทารกในครรภ์ออกได้เป็น 3 กลุ่มคือทารกปกติ, ทารกที่เป็นพาหะของโรค และทารกที่เป็นโรค ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการเปรียบเทียบลักษณะของเม็ดเลือดแดงระหว่างทารกทั้ง 3 กลุ่มดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการเปรียบเทียบค่าดัชนีต่าง ๆ ของเม็ดเลือดแดง (ได้แก่ค่า MCV, MCH และ MCHC) รวมถึงค่าความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (ระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน) และระดับภาวะซีด ระหว่างทารกทั้ง 3 กลุ่มนี้ ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ และแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด

จากการศึกษาผลการตรวจเลือดสายสะดือของทารกในครรภ์ช่วงอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ทั้งหมด 88 ราย เพื่อวัดค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดง และใช้การตรวจวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอเป็นการวินิจฉัยว่าทารกอยู่ในกลุ่มปกติ, เป็นพาหะ หรือเป็นโรค พบว่าทารกทั้ง 3 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งระดับความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงทั้ง 3 ค่า (MCV, MCH, MCHC) และที่น่าสนใจคือทารกในกลุ่มที่เป็นพาหะของโรคโลหิตจางธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา 1 ยังคงมีค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงทุกค่าที่แตกต่างจากทารกปกติอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าเกือบทั้งหมด (ร้อยละ 92) ของทารกในกลุ่มที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดฮีโมโกลบินบาร์ท มีภาวะซีดเกิดขึ้นแล้วในช่วงอายุครรภ์นี้ แต่ระดับความรุนแรงต่างกันไป แต่พบว่ามีทารกในกลุ่มที่เป็นโรคอยู่จำนวน 2 ราย ที่ไม่มีภาวะซีดแต่มีอาการหัวใจโตซึ่งแสดงถึงการบวมน้ำ จึงเป็นที่น่าสนใจว่ากลไกการเกิดและการดำเนินโรคนี้อาจมีบางสิ่งที่แตกต่างไปจากโรคบวมน้ำจากสาเหตุอื่นๆได้

โดยสรุปแล้วการศึกษานี้ได้ให้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับค่าดัชนีต่างๆของเม็ดเลือดแดงในทารกทั้ง 3 กลุ่มของโรคธาลัสซีเมียชนิดสายอัลฟา คือทารกปกติ, ทารกที่เป็นพาหะ และทารกที่เป็นโรค ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันในทุกๆค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการสังเกตระดับความรุนแรงและภาวะซีดที่เกิดขึ้นทำให้ได้ข้อสังเกตว่า ทารกกลุ่มที่เป็นโรคเกือบทุกรายจะเกิดอาการซีดขึ้นแล้วตั้งแต่วัยอายุครรภ์ 18-22 สัปดาห์ ซึ่งทำให้การวินิจฉัยโรคน่าจะทำได้เกือบทั้งหมดตั้งแต่วัยอายุครรภ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามทารกบางรายไม่มีภาวะซีดแต่มีการบวมน้ำซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจและเป็นเรื่องที่สมควรศึกษาเพิ่มเติมอย่างละเอียดในอนาคต

ภาคผนวก

ภาคผนวก ประกอบด้วยเอกสารดังนี้

1. เอกสารสรุปผลงานวิจัยสำหรับเผยแพร่ให้แก่บุคคลทั่วไปทั้งงานวิจัยส่วนที่ 1 และงานวิจัยส่วนที่ 2
2. Manuscript ของงานวิจัยส่วนที่ 1 เรื่อง Identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses using Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery ที่อยู่ในระหว่างการ submission
3. Manuscript ของงานวิจัยส่วนที่ 2 เรื่อง Comparison of red blood cell hematology among normal and alpha-thalassemia-1 trait and hemoglobin Bart's fetuses at mid-pregnancy ที่อยู่ในระหว่างการ submission
4. Abstract ของ preliminary report ของงานวิจัยส่วนที่ 1 ซึ่งนำเสนอในการประชุมประจำปีของราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย
5. Powerpoint presentation ของ preliminary report ของงานวิจัยส่วนที่ 1 ซึ่งนำเสนอในการประชุมประจำปีของราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย

Identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses using Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery

Kasemsri Srisupundit MD*, Wirawit Piyamongkol MD*,
Theera Tongsong MD*

* Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Abstract

Objective: To determine the sensitivity and specificity of Middle Cerebral Artery-peak systolic velocity (MCA-PSV) for identification of homozygous alpha thalassemia 1 fetuses **at mid-pregnancy among pregnancies at risk**

Study design: Diagnostic test

Material & Method: A total of 88 **pregnancies (91 fetuses) at risk** of homozygous alpha thalassemia-1, undergoing MCA-PSV measurement before performing cordocentesis at 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were recruited into the study. The final diagnoses used as gold standard were based on fetal hemoglobin typing using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The main outcome measure was the sensitivity and specificity of MCA-PSV **in predicting** homozygous alpha thalassemia-1 fetuses.

Results: Of 88 pregnant women recruited into the study, the mean age was 28.3±5.7 years, the mean gestational age was 18.8±1.06 weeks, **and** the incidence of homozygous alpha thalassemia-1 was 22% (20 fetuses). If using MCA-PSV above 1.5 Multiple of Median (MoM) as a cut off point, the sensitivity of MCA-PSV to **detect** homozygous alpha thalassemia-1 fetuses was 85% (17 from 20 cases), specificity was 100%, and the positive predictive value and negative predictive value of MCA-PSV were 100% and 95.89% respectively. **Three out of 20 fetuses with** homozygous alpha thalassemia-1 **had** normal MCA-PSV.

Conclusion: MCA-PSV **assessment at mid-pregnancy** is a useful method to identify homozygous alpha thalassemia-1 fetuses with high sensitivity and specificity, and may reduce risk from unnecessary cordocentesis in some fetuses.

Keywords: Homozygous alpha thalassemia-1, Middle Cerebral Artery – peak systolic velocity (MCA-PSV)

Introduction

Homozygous alpha-thalassemia-1 is the most common cause of hydrops fetalis in South East Asia. As a result of population migrations during the past decade, this syndrome is now seen with increasing frequency in other parts of the world. The affected fetuses inevitably are either stillborn or die soon after birth. Furthermore, serious obstetric complications frequently accompany affected pregnancies, including preeclampsia, dystocia, postpartum hemorrhage due to large placenta, and the psychological burden of carrying a nonviable fetus to term. It is therefore essential that prenatal diagnosis and early termination of the pregnancy be recommended. At present, prenatal diagnosis

usually is done by DNA analysis or fetal blood analysis. However, these techniques are invasive, and resources for analysis may be limited in areas where the disease is prevalent. Although the classic hydropic changes due to Hb Bart disease are likely to occur after 20 weeks. Currently it is well established that middle cerebral artery peak systolic velocity (MCA-PSV) is effective in predicting anemia due to various causes, especially Rh isoimmunization[2-6], Kell alloimmunization[7], parvovirus infection[5, 8, 9], placental chorioangioma[10] and possibly including homozygous alpha-thalassemia-1. To date, only few studies on the role of MCA-PSV in detection of fetal anemia secondary to homozygous alpha thalassemia-1 disease.[11, 12] Moreover, the accuracy of MCA-PSV in predicting fetus with homozygous thalassemia1 at mid-pregnancy has never been studied. The purpose of this study was to determine the sensitivity and specificity of MCA-PSV in detection of homozygous alpha thalassemia-1 among fetuses at risk at mid-pregnancy. Among fetuses at risk, if MCA-PSV assessment is effective in differentiating affected from unaffected ones, it may play an important role in identifying those who need invasive diagnostic procedure or those who can be reassured for normality and need no unnecessary invasive intervention.

Material & Method

A total of eighty-eight pregnant women (ninety-one fetuses), at risk of having fetuses with homozygous alpha thalassemia-1 disease, decided to receive prenatal diagnosis using cordocentesis and were recruited into the study. All underwent MCA-PSV measurement before performing cordocentesis at 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, between May 2007 and April 2008. All ultrasound examinations including MCA-PSV measurements were performed by eight experienced perinatologists with real-time equipment using Aloka Prosound 5000, or Aloka SSD alpha-10 (Tokyo, Japan) with transabdominal 3.5 MHz curvilinear transducers. The measurement of MCA Doppler waveforms was done with the technique described by Mari G.[13] as follows: Firstly, the pregnant woman was placed in semi-recumbent, and then trans-abdominal ultrasound examination was performed as a routine standard technique, such as fetal biometry and fetal anatomical survey. Doppler measurements were obtained at a physiologic fetal heart rate of 120 to 160 bpm in the absence of maternal or fetal breathing movements. The MCA was visualized in a transverse plane. The fetal head was initially viewed in the plane typically used for biometry, and subsequently lowered more caudal to the base of the brain. Immediately below the thalamus, a round slightly echogenic pulsation is visualized, which corresponds to the circle of Willis. The middle cerebral artery branches off the circle of Willis at both sides, and continues anterolateral to the orbits, at the level of the sphenoid bone. In using color Doppler, the Doppler gate was positioned in the proximal third of the middle cerebral artery, and the blood flow velocities were derived at an angle of insonation of $< 10^\circ$. Calculation for 3 uniform cardiac cycles was made from the still image by an automatic wave form analysis integrated into the ultrasound device. Abnormal increase in MCA-PSV was defined as the value above 1.5 Multiple of Median (MoM) of each gestational age using nomogram of Thai population that reported by Tongsong T.[14] Cordocentesis was performed after MCA-PSV measurement. The final diagnoses used as gold standard were based on fetal hemoglobin typing using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The main outcome measure was the sensitivity and specificity of MCA-PSV in identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses. The conduction of this study was approved by ethic committee and supported by Thailand Research Fund (TRF).

Results

During the study period, a total of 88 pregnant women (91 fetuses) were recruited into the study. The mean ($\pm$ SD) age of the population was 28.3 ± 5.7 years, ranging from 15-44 years. The mean ($\pm$ SD) gestational age was 18.8 ± 1.06 weeks. Among 91 fetuses, one fetus was excluded from the study. This fetus had an increase in MCA-PSV, and signs of frank hydrops fetalis. Though the fetus was provisionally diagnosed for homozygous thalassemia-1 disease, the fetal blood could not be obtained from cordocentesis and the fetus was dead later. Of the remaining 90 fetuses, the incidence of homozygous alpha thalassemia-1 was 22% (20 from 90 fetuses). When using MCA-PSV above 1.5 MoM as a cut off point, the sensitivity of MCA-PSV in detection of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses was 85% (17 from 20 cases), specificity was 100%, and the positive predictive value and negative predictive value of MCA-PSV were 100% and 95.89% respectively as shown in Table 1. Notably, three affected fetuses had normal MCA-PSV, however the levels in all of them were nearly close to the cut-off point, as demonstrated in Table 2. Furthermore, these three fetuses also showed cardiomegaly, as seen in an increased cardiothoracic ratio.

Table 1: The 2 x 2 Table between result of HPLC and MCA-PSV value

MCA-PSV	HPLC (cases)	
	Hemoglobin Bart's fetuses	Non hemoglobin Bart's fetuses
> 1.5 MoM	17	0
$\leq$ 1.5 MoM	3	70

Sensitivity of MCA-PSV	=	85%	(95% CI 0.69-1.00)
Specificity of MCA-PSV	=	100%	(95% CI 1.00-1.00)
Positive predictive value	=	100%	(95% CI 1.00-1.00)
Negative predictive value	=	95.89%	(95% CI 0.86-1.05)

Table 2: Three cases of homozygous alpha thalassemia-1 and normal MCA-PSV

Case	GA [#]	MCA-PSV (cm/sec)	1.5 MoM of MCA-PSV	Hb ^{\$} level	Degree of anemia [*]	C/T Ratio (%)
1	19	32.6	33.0	8.7	Mild	54
2	20	33.4	35.1	6.5	Moderate	61
3	18	28.2	30.9	6.9	Mild	60

: Gestational age (weeks), \$: Hemoglobin (gm/dl),

* : Diagnosed from nomogram of fetal hemoglobin level at each gestational age[15]

Discussion

MCA-PSV measurement is non invasive method in diagnosis, evaluation and management of fetal anemia from various causes.[2-8, 10, 13, 15-20] Even though

there is extensive overlap of MCA-PSV between anemic and non-anemic fetuses in first trimester gestation[11], MCA-PSV is also helpful in establish the diagnosis of first trimester fetal anemia in one study.[18] To date, there are very few studies regarding MCA-PSV in diagnosis and management of fetuses at risk for homozygous alpha thalassemia-1. Though, some studies have found that MCA-PSV might be useful in assessment of fetal anemia secondary to homozygous alpha thalassemia-1 disease[11, 12, 16], the study on evaluation of its effectiveness in predicting anemia among fetuses at risk of the disease at mid-pregnancy has never been published. As previously described, homozygous alpha thalassemia-1 is the most common cause of hydrops fetalis in Thailand as well as South East Asia. In our current practice, 75% of fetuses at risk for homozygous alpha thalassemia-1 have to take risk from invasive prenatal diagnostic procedure as cordocentesis. Therefore, this study was conducted in the hope that MCA-PSV assessment may be helpful in reducing the need for unnecessary cordocentesis.

Although two twin pregnancies were included in this study, this does not seem to affect the result since MCA-PSV in uncomplicated twin is not different in singleton pregnancy.[21] Although MCA is readily accessible vessel, the inappropriate measurement of MCA-PSV by inexperienced operator can do more harm than good[20, 22]. In this study, we have standardized the techniques of MCA-PSV measurement with all of eight experienced perinatologists to minimize inter-observer variation.[13, 23] From the present study, MCA-PSV has high sensitivity and specificity (85% and 100% respectively) in identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses. Moreover, the positive and negative predictive values are also high (100% and 95.89% respectively). Therefore, MCA-PSV is most likely to have a role in diagnosis of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses. On the other hand, the benefit of MCA-PSV is to rule out homozygous alpha thalassemia-1 fetus. For instance, fetuses that are at risk of homozygous alpha thalassemia-1 but have normal MCA-PSV are suitable for non invasive prenatal diagnosis as serial ultrasonography to detect hydropic change more than invasive procedure as cordocentesis. Otherwise, longitudinal assessment of MCA-PSV may have benefit to detect fetal anemia from homozygous alpha thalassemia-1 before hydropic change has occurred as seen in many studies of fetal Rh-immunization.[24, 25]

However, three cases of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses could not be detected by abnormal MCA-PSV. Interestingly all of these three cases had a relatively high MCA-PSV value close to the cut-off level at 1.5 MoM. Even though the most accepted cut off point of an increase in MCA-PSV is the value above 1.5 MoM of each gestational age[13, 26], this value was derived from many studies on population of fetal anemia caused by isoimmunization. Therefore, it is possible that the most appropriate cut-off point of MCA-PSV to detection fetal anemia from homozygous alpha thalassemia-1 disease may below 1.5 MoM. However, the population in this study is not large enough to define the best cut-off point in this situation. Thus the larger study is required to demonstrate the most appropriate cut off point of MCA-PSV to identify homozygous alpha thalassemia-1 fetuses. Furthermore, all of the three affected fetuses with normal MCA-PSV had cardiomegaly which defined by cardiothoracic ratio (C/T Ratio) exceed 50%. According to the result of this study, if MCA-PSV and C/T Ratio were used in combination, the sensitivity to detection homozygous alpha thalassemia-1 fetuses might be increased.

However, a limitation must be stressed. The high accuracy in this study represents that subjectively assessed by an experienced sonographer, therefore, it may probably not be reproducible by sonographers not familiar with MCA-PSV

measurement. Furthermore, the bias in this study might have existed. This was due to the fact that color Doppler evaluation was not a blind method since the examiner had known the morphology of the fetuses from conventional sonographic images. Therefore, signs of early hydropic change of affected fetuses including cardiomegaly, pericardial effusion, polyhydramnios and ascites could be visible in some cases and the diagnosis of fetuses might have been anticipated in such cases.

Another limitation of this study is that inter-observer variation among all sonographers were not tested, even using the same and standard technique of MCA-PSV measurement. On the other hand, the strength of this study included the adequate number of homozygous alpha thalassemia-1 cases and using reference range of MCA-PSV nomogram of Thai population which conducted in our hospital.[14] Moreover, the MCA-PSV measurement in this study is not interrupt the process of taking care of patients because the measurement was done completely within the limit of 30 minutes by any perinatologists in our unit and cordocentesis was performed immediately after the examinationis. Therefore, all process in this study is represent the real hospital service setting and can apply into routine clinical practice easily.

Among fetuses at risk, abnormal high MCA-PSV was never seen in unaffected fetuses in our study and, therefore, it is highly suggestive, if not absolutely diagnostic, of being affected, regardless the presence of other sonomarkers. Likewise, fetuses with normal are very unlikely to be affected. However few affected fetuses may be overlooked.

It is important to emphasize that normal MCA-PSV at 18 to 22 weeks is reassuring and may obviate the need for further invasive procedures to confirm normality, although follow-up sonography may be required. With this approach, invasive procedures can be selectively performed, and fewer pregnancies will be lost unnecessarily. The reduction in medical expenses and procedure related fetal loss is likely to be substantial.

Therefore, cordocentesis or DNA analysis should be reserved only for cases with positive sonographic markers. Moreover, this diagnostic approach is extremely valuable in areas where the disease is prevalent and cordocentesis or DNA analysis is not readily available. Although a few affected fetuses may be missed by this approach, they can be suspected or detected for hydropic changes by later serial sonography. Moreover, because the disease is uniformly lethal, and termination of pregnancy can be offered at any time when the diagnosis is reliably made, missing a very small number of cases will not affect overall outcome greatly. Despite the high accuracy of MCA-PSV, the diagnosis should be confirmed with definitive methods such as fetal blood analysis to exclude false-positive findings, although very infrequent, and hydrops fetalis secondary to other causes.

In conclusion, among couples at risk with normal MCA-PSV, the risk of having an affected child is nearly eliminated. Pregnancies at risk have a 25% chance of having an affected child, and 75% of them carry fetuses without abnormalities and risk undergoing unnecessary invasive procedures. MCA-PSV can effectively, although not absolutely, differentiate normal pregnancies from those requiring an invasive workup. Therefore, our findings can contribute to a change in clinical decision making, especially for pregnancies at risk that are examined during the second trimester, and MCA-PSV assessment should be taken into account as a part of routine screening for fetal anomalies as well, especially in areas with high prevalence of the disease. This study has established the new sonographic signs of Hb Bart disease at midpregnancy;

therefore, further studies should concentrate on first-trimester sonographic findings, especially the C/T ratio, as suggested by previous studies.

In our population, the main prenatal diagnostic technique for homozygous alpha-thalassemia¹ is cordocentesis at 18 to 21 weeks, and it is performed only in tertiary centers. It is very important for community hospitals to select only cases at high risk for Hb Bart disease for referral for invasive prenatal diagnosis. Therefore, the measurement of MCA-PSV should be an alternative cost-effective method in identifying cases for referral or follow-up with serial ultrasonography in their own hospitals. With this approach, invasive procedures can be performed selectively, and fewer fetuses will be lost unnecessarily. The reduction in medical expenses and procedure-related fetal loss is likely to be substantial. Although a few affected fetuses may be missed by this approach, these cases can be suspected or detected by later serial ultrasonography. Moreover, since the disease is uniformly lethal and termination of pregnancy can be offered any time when the diagnosis is made reliably, missing it in a very small number of cases will not so greatly influence the overall outcome. Despite the high accuracy of MCA-PSV measurement, the diagnosis should be confirmed with definitive methods, such as fetal blood analysis, to exclude false positive results, even though the rate is very low, and hydrops fetalis secondary to other causes.

Acknowledgement

Thailand Research Fund (TRF): for supporting the conduct of this study.

References

- [1] Chan LW, Lau TK, Chung TK. Fetal anaemia as a cause of fetal injury: diagnosis and management. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2006 Apr;18(2):100-5.
- [2] Ahmed B, Ghaffari Z, Ismail RS, Saleh N. Non-invasive diagnosis of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *Saudi medical journal*. 2005 Feb;26(2):256-9.
- [3] Alshimmiri MM, Hamoud MS, Al-Saleh EA, Mujaibel KY, Al-Harmi JA, Thalib L. Prediction of fetal anemia by middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by rhesus isoimmunization. *J Perinatol*. 2003 Oct;23(7):536-40.
- [4] Bullock R, Martin WL, Coomarasamy A, Kilby MD. Prediction of fetal anemia in pregnancies with red-cell alloimmunization: comparison of middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid OD450. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005 Apr;25(4):331-4.
- [5] Delle Chiaie L, Buck G, Grab D, Terinde R. Prediction of fetal anemia with Doppler measurement of the middle cerebral artery peak systolic velocity in pregnancies complicated by maternal blood group alloimmunization or parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001 Sep;18(3):232-6.
- [6] Pereira L, Jenkins TM, Berghella V. Conventional management of maternal red cell alloimmunization compared with management by Doppler assessment of middle cerebral artery peak systolic velocity. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003 Oct;189(4):1002-6.

- [7] Rimón E, Peltz R, Gamzu R, Yagel S, Feldman B, Chayen B, et al. Management of Kell isoimmunization--evaluation of a Doppler-guided approach. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006 Nov;28(6):814-20.
- [8] Cosmi E, Mari G, Delle Chiaie L, Detti L, Akiyama M, Murphy J, et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia resulting from parvovirus infection. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2002 Nov;187(5):1290-3.
- [9] Morel O, Chagnaud S, Laperrelle J, Clement D, Malartic C, Akerman G, et al. [Parvovirus B19 in pregnancy: literature review]. *Gynecologie, obstetrique & fertilite.* 2007 Nov;35(11):1095-104.
- [10] Escribano D, Galindo A, Arbues J, Puente JM, De la Fuente P. Prenatal management of placental chorioangioma: value of the middle cerebral artery peak systolic velocity. *Fetal diagnosis and therapy.* 2006;21(6):489-93.
- [11] Lam YH, Tang MH. Middle cerebral artery Doppler study in fetuses with homozygous alpha-thalassaemia-1 at 12-13 weeks of gestation. *Prenatal diagnosis.* 2002 Jan;22(1):56-8.
- [12] Maguire K, Johnson A, Ou CN, Lantin RL, Moise KJ. Elevated middle cerebral artery peak systolic velocity without fetal anemia in a case of homozygous alpha-thalassemia-1. *Prenatal diagnosis.* 2008 Jan;28(1):72-4.
- [13] Mari G. Middle cerebral artery peak systolic velocity for the diagnosis of fetal anemia: the untold story. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005 Apr;25(4):323-30.
- [14] Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K. Middle cerebral artery peak systolic velocity of healthy fetuses in the first half of pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2007 Aug;26(8):1013-7.
- [15] Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, Jr., et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *The New England journal of medicine.* 2000 Jan 6;342(1):9-14.
- [16] Hernandez-Andrade E, Scheier M, Dezerega V, Carmo A, Nicolaides KH. Fetal middle cerebral artery peak systolic velocity in the investigation of non-immune hydrops. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 May;23(5):442-5.
- [17] Imbar T, Lev-Sagie A, Cohen S, Yanai N, Yagel S. Diagnosis, surveillance, and treatment of the anemic fetus using middle cerebral artery peak systolic velocity measurement. *Prenatal diagnosis.* 2006 Jan;26(1):45-51.
- [18] Kempe A, Rosing B, Berg C, Kamil D, Heep A, Gembruch U, et al. First-trimester treatment of fetal anemia secondary to parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Feb;29(2):226-8.
- [19] L'Ubusky M, Prochazka M, Santavy J, Mickova I, Machac S, Kantor L. [Contribution of Doppler examination in pregnancy at risk of alloimmune fetus anemia]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev.* 2005 Jan;70(1):27-9.
- [20] Mari G. Middle cerebral artery peak systolic velocity: is it the standard of care for the diagnosis of fetal anemia? *J Ultrasound Med.* 2005 May;24(5):697-702.
- [21] Dashe JS, Ramus RM, Santos-Ramos R, McIntire DD, Twickler DM. Middle cerebral artery peak systolic velocity in monochorionic and dichorionic twin pregnancies. *J Ultrasound Med.* 2007 Feb;26(2):195-200.
- [22] Lubusky M, Prochazka M, Santavy J, Mickova I, Kantor L. [Actual management of pregnancies at risk for fetal anemia]. *Ceska gynekologie / Ceska lekarska spolecnost J Ev.* 2006 Jul;71(4):272-80.

- [23] Mari G, Abuhamad AZ, Cosmi E, Segata M, Altaye M, Akiyama M. Middle cerebral artery peak systolic velocity: technique and variability. *J Ultrasound Med.* 2005 Apr;24(4):425-30.
- [24] Detti L, Mari G, Akiyama M, Cosmi E, Moise KJ, Jr., Stefor T, et al. Longitudinal assessment of the middle cerebral artery peak systolic velocity in healthy fetuses and in fetuses at risk for anemia. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2002 Oct;187(4):937-9.
- [25] Mari G, Zimmermann R, Moise KJ, Jr., Deter RL. Correlation between middle cerebral artery peak systolic velocity and fetal hemoglobin after 2 previous intrauterine transfusions. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2005 Sep;193(3 Pt 2):1117-20.
- [26] Scheier M, Hernandez-Andrade E, Carmo A, Dezerega V, Nicolaides KH. Prediction of fetal anemia in rhesus disease by measurement of fetal middle cerebral artery peak systolic velocity. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004 May;23(5):432-6.

Comparison of red blood cell hematology among normal and alpha-thalassemia-1 trait and hemoglobin Bart's fetuses at mid-pregnancy

Kasemsri Srisupundit MD*, Wirawit Piyamongkol MD*,
Theera Tongsong MD*

* Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Abstract

Objective: To compare red blood cell indices among normal and alpha-thalassemia-1 trait, and hemoglobin Bart's fetuses at mid-pregnancy

Study design: Descriptive study

Material & Method: A total of 87 pregnancies (88 fetuses) at risk of homozygous alpha thalassemia-1, undergoing cordocentesis including measurement of hemoglobin level and red blood cell indices of fetuses at 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were recruited into the study. The final outcome was based on fetal DNA analysis using polymerase chain reaction (PCR) technique. Fetuses were divided into 3 groups which are normal, alpha-thalassemia-1 trait (SEA deletion) and homozygous alpha-thalassemia-1 (Hemoglobin Bart's disease). The main outcome measure was hematology of red blood cell indices and degree of anemia of fetuses in each group.

Results: Of 87 pregnant women recruited into the study, the mean gestational age was 18.7 ± 0.8 weeks. According to DNA analysis, the incidence of hemoglobin Bart's disease, alpha thalassemia-1 trait and normal fetuses were 29.5%, 45.5% and 25% respectively. The mean of hemoglobin level, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean cell hemoglobin concentration (MCHC) were significantly difference in 3 groups of fetuses. Moreover, these differences were also found between fetuses with alpha-thalassemia-1 trait and normal fetuses. Ninety-two percent of fetuses with hemoglobin Bart's disease had some degree of anemia at mid-pregnancy. However, there are two hemoglobin Bart's fetuses which did not have anemia. Furthermore, two fetuses in the alpha-thalassemia-1 trait group were mildly anemic, but most (95%) were not.

Conclusion: There was highly significant difference in hematology of red blood cell indices between normal, alpha-thalassemia-1 trait and Hemoglobin Bart's fetuses, and

most fetuses with hemoglobin Bart's disease have some degree of anemia from mid-pregnancy on.

Keywords: alpha-thalassemia, hematology, mid pregnancy

Introduction

Alpha-thalassemia-1 gene is one of the most common gene defects in South East Asia. The homozygous state is associated with hemoglobin (Hb) Bart's disease, a major public health problem in South East Asia. According to the Chiang Mai strategy for prenatal control of severe thalassemia[1], three entities of alpha-thalassemia-1 status can be categorized in fetuses of couple at risk for Hb Bart's disease, including the most severe or lethal form (Hb Bart's fetuses) and the other two forms of no any clinical pictures; heterozygous alpha-thalassemia-1 (alpha-thalassemia-1 trait) and normal fetuses. Though we have extensive experience on prenatal diagnosis of Hb Bart's disease, little is known about red blood cell indices of these fetuses, in spite of the fact that these basic data may be helpful in differentiating the affected fetuses among couples at risk. Even though some studies about hematology of normal fetuses at mid-pregnancy have been published[2-10], to date, no study on hematology of red blood cell series in various aspects of alpha-thalassemia-1 fetuses at mid-pregnancy period has been reported. The aim of this study is to determine the normal reference range of the red blood cell indices as well as to compare red blood cell indices among normal, alpha-thalassemia-1 trait and Hb Bart's fetuses at mid-pregnancy.

Material & Method

A total of 88 pregnant women (89 fetuses) at risk of having fetuses with homozygous alpha-thalassemia-1 (Hb Bart's) disease, who underwent cordocentesis for prenatal diagnosis, were recruited into the study. Cordocentesis were performed during 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai hospital, between May 2007 and July 2008. Fetal blood samples in amount of 0.5-1 ml were collected for analysis of red blood cell indices, consisting of hemoglobin (Hb) level, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC) and severity of anemia for each fetus. All cordocenteses were performed by eight experienced perinatologists under guidance of real-time ultrasound equipment using Aloka Prosound 5000, or Aloka SSD Prosound alpha-10 (Tokyo, Japan) with

transabdominal 3.5 MHz curvilinear transducers. All parameters of hematology were measured within 24 hours after cordocentesis using automated complete blood count (CBC) machine. Severity of anemia in each fetus is defined from nomogram of hemoglobin level of fetus in each gestational age.[11]

The final diagnosis of alpha-thalassemia-1 status was based on fetal DNA analysis using polymerase chain reaction (PCR) technique for alpha-thalassemia-1 deletion (SEA type) detection. The oligonucleotide primer sequences for alpha-thalassemia-1 (SEA deletion) are S1: 5'-CTG GGC TCT GTG TTC TCA G-3', S2: 5'-GAC ACG CTT CCA ATA CGC-3', S3: 5'-TAC TGC AGC CTT GAA CTC C-3' as start, normal allele and mutant allele respectively. All fetuses were divided into 3 groups according to the result of DNA analysis as follows: normal, heterozygous alpha-thalassemia-1 (alpha-thalassemia-1 trait) and homozygous alpha-thalassemia-1 (Hb Bart's). The conduction of this study was approved by ethic committee and supported by Thailand Research Fund (TRF).

Results

Of 88 pregnant women with 89 fetuses recruited into the study, the mean gestational age was 18.7 ± 0.85 weeks. One fetus was excluded from the study due to severe anemia from hemoglobin H / constant spring disease and the remaining 88 fetuses were available for analysis. The incidence of Hb Bart's disease, alpha-thalassemia-1 trait and normal fetuses was 29.5 % (26 cases), 45.5 % (40 cases) and 25 % (22 cases), respectively. The hematology of red blood cell series (Hb level, MCV, MCH and MCHC) of the fetuses in each group is presented in Table 1. These parameters are significantly different among 3 groups of fetuses. Moreover, the difference of mean Hb level, MCV, MCH and MCHC between normal fetuses and alpha-thalassemia-1 trait fetuses is also highly significant ($p\text{-value} < 0.001$) for all parameters.

Table.1 Hematology of red blood cell indices in mid-pregnancy fetuses (ANOVA test)

Red blood cell parameters	Fetuses (88 cases)			P- value
	Normal (22 cases)	Alpha-1 trait (40 cases)	Hb Bart's disease (26 cases)	
Hb level (gm/dl)	11.34 $\pm$ 0.83	10.42 $\pm$ 0.91	6.4 $\pm$ 1.64	< 0.001
MCV (fl)	123.40 $\pm$ 7.76	105.95 $\pm$ 7.35	96.26 $\pm$ 8.19	< 0.001
MCH (pg)	41.39 $\pm$ 3.35	33.71 $\pm$ 2.74	26.23 $\pm$ 2.6	< 0.001
MCHC (g/L)	33.44 $\pm$ 1.3	31.81 $\pm$ 1.09	27.29 $\pm$ 1.78	< 0.001

Severity of anemia of the fetuses in each group is presented in Table 2. According to this study, no fetus in normal group was anemic, whereas 92.3 % (24 from 26 cases) of fetuses with Hb Bart's disease had some degree of anemia at mid-pregnancy. Interestingly, two fetuses with hemoglobin Bart's disease which had no anemia had normal Middle cerebral artery peak systolic velocity (MCA-PSV), but both of them showed cardiomegaly, which is a sign of hydrops fetalis.

Table.2 Severity of anemia of fetuses in each group

Severity of anemia*	Fetuses (Total 88 cases)		
	Normal Cases (%)	Alpha-1 trait Cases (%)	Hb Bart's disease Cases (%)
No anemia	22 (100)	38 (95)	2 (7.7)
Mild anemia	0	2 (5)	6 (23.1)
Moderate anemia	0	0	11 (42.3)
Severe anemia	0	0	7 (26.9)
Total (cases)	22	40	26

* Severity of anemia in each fetus is defined from nomogram of hemoglobin level of fetus in each gestational age.[11]

From this study, most fetuses with alpha-thalassemia-1 trait were not anemic (95%, 38 from 40 cases) even the mean of hemoglobin level in this group of fetuses was significantly different from normal fetuses as shown in Table 1. However two fetuses in this group had mild degree of anemia. There were no other abnormalities of

sonographic finding including hydropic change in both fetuses. One fetus was a referral case and delivered by cesarean delivery in other hospital, the baby weigh 2300 grams and healthy. The other one has not delivered so far.

Discussion

Alpha-thalassemia-1 is one of the most common hematologic problems in South East Asian area. The gene frequencies of alpha-thalassemia-1 in Northern Thailand is 10%.[12] In this study, we used Chiang Mai strategy for prenatal control of severe thalassemia to screen pregnant women and to identify couple at risk[1]. In routine practice, we perform cordocentesis to obtain fetal blood and make prenatal diagnosis with hemoglobin typing using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. However, the effectiveness in discriminating fetuses with alpha-thalassemia-1 trait from normal fetuses may not be reliable with HPLC technique. Therefore, the final diagnosis in this study was based on the DNA analysis with Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Because the most common alpha-thalassemia-1 deletion in our region is SEA type, so we performed PCR for identifying alpha-thalassemia-1 gene deletion for South East Asia (SEA) type only. We did not identify status of alpha-thalassemia-2 deletion in this study, because patient with alpha-thalassemia-2 trait does not have clinically different from normal population and is of no concern in prenatal diagnosis. Finally, among couples at risk of alpha-thalassemia, all fetuses in this study will be categorized into three groups which are normal, heterozygous alpha-thalassemia-1 (alpha-thalassemia-1 trait) and homozygous alpha-thalassemia-1 (Hb Bart's disease).

According to the result of this study, the hemoglobin levels and red blood cell indices (MCV, MCH, MCHC) of fetal blood in mid-pregnancy are highly significant different among three groups of fetuses (P -value < 0.001). For Hb Bart's disease, this finding can simply be explained by the pathophysiology of the disease that has inadequate production of alpha-globin, and fetuses have anemia in utero. Therefore, the mean of hemoglobin and red blood cell indices of fetuses with Hb Bart's disease are significantly low (mean hemoglobin level 6.4 gm/dl) when compared to normal or alpha-thalassemia-1 trait fetuses.

Interestingly, all parameters of red blood cell indices such as MCV, MCH, and MCHC in alpha-thalassemia-1 trait fetuses are significantly lower than those of normal fetuses. This pattern seems to be the same as found in adult with alpha-thalassemia-1 trait, though the absolute levels may be different. These findings suggest that cord blood analysis for red cell indices of newborns may be useful as screening method for

alpha-thalassemia-1 trait in general population in the future. Surprisingly, the mean hemoglobin level of fetuses with alpha-thalassemia-1 trait is also significantly lower than that of normal fetuses ($p\text{-value} < 0.001$). In general, we assume that individual with alpha-thalassemia-1 trait is not anemic and is of no concern for diagnosis. However, our findings give some new insights on this mutation. Although, we usually presume that heterozygote of alpha-thalassemia-1 can perfectly compensate, resulting in normal phenotype, the gene compensation is not perfect some degree of hemoglobin reduction can be encountered in utero.

The weakness of this study is that other genes defects responsible for globin chain production which we did not identify may exist in the subject of alpha-thalassemia-1. However, this confounder is very unlikely to affect the results when compared to the normal subjects, since other gene defects should distribute equally to the both groups.

In group of fetuses with Hb Bart's disease, 93% of fetuses have some degree of anemia but the severity is unpredictable. Nevertheless, nearly half of fetuses (42%) have moderate degree of anemia, and severe anemia was found about 27% of fetuses in this group. This finding implies that majority of fetuses with Hb Bart's disease will be anemia since mid-gestation period, and the diagnosis should be made in nearly all fetuses at this gestational age. Interestingly, two fetuses with Hb Bart's disease were not anemic and showed normal middle cerebral artery peak systolic velocity, indirectly indicating no functional anemia in utero but these two fetuses had signs of cardiac compensation or impending hydrops fetalis, indicated by significant cardiomegaly. This finding addresses the hypothesis of pathophysiology of hydrops fetalis. Our finding suggests that, other than low hemoglobin levels, poor oxygenation due to low quality of hemoglobin (Hb Bart's) partly play a role in high output cardiac failure as seen in case of no anemia. Therefore, it is possible that pathophysiology of anemia secondary to Hb Bart's disease is not exactly the same as anemia from Rh-isoimmunization. The fetuses with Hb Bart's disease do not always have to have hemoglobin concentration as low as that in fetuses with Rh-isoimmunization.

On the contrary to the fetuses with Hb Bart's disease, nearly all fetuses with alpha-thalassemia-1 trait were not anemic but only few cases showed mild degree of anemia, though these fetuses have significantly lower hemoglobin levels than normal fetuses. Unlike anemia due to Hb Bart's disease or even some cases of hemoglobin H disease[13, 14], anemia due to alpha-thalassemia-1 trait never led to hydrops fetalis.

The strength of this study included the adequacy of sample size and high reliability of final DNA-based diagnosis as well as hematologic studies which were performed within 24 hours after cordocentesis. In addition, this study gives new insights on phenotypic expression of alpha-thalassemia-1 gene as well as pathophysiology of Hb Bart's hydrops fetalis. Hematologic studies among normal, alpha-thalassemia-1 trait, and Hb Bart's fetuses from this study may serve as reference range for future study or even clinical application. There are few studies about screening test of alpha-thalassemia-1 from hemoglobin Bart's level in umbilical cord blood[15-18]. However, if using automated complete blood count (CBC) machine, the red blood cell indices can be measured more easily than hemoglobin Bart's level measurement.

Acknowledgement

The authors wish to thank the Thailand Research Fund (TRF) for funding the conduct of this research.

References

- [1] Tongsong T, Wanapirak C, Sirivatanapa P, Sanguansermsri T, Sirichotiyakul S, Piyamongkol W, et al. Prenatal control of severe thalassaemia: Chiang Mai strategy. *Prenat Diagn.* 2000 Mar;20(3):229-34.
- [2] Millar DS, Davis LR, Rodeck CH, Nicolaides KH, Mibashan RS. Normal blood cell values in the early mid-trimester fetus. *Prenat Diagn.* 1985 Nov-Dec;5(6):367-73.
- [3] Forestier F, Daffos F, Galacteros F, Bardakjian J, Rainaut M, Beuzard Y. Hematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Pediatr Res.* 1986 Apr;20(4):342-6.
- [4] Ludomirsky A, Weiner S, Ashmead GG, Librizzi RJ, Bolognese RJ. Percutaneous fetal umbilical blood sampling: procedure safety and normal fetal hematologic indices. *Am J Perinatol.* 1988 Jul;5(3):264-6.
- [5] Nicolaides KH, Snijders RJ, Thorpe-Beeston JG, Van den Hof MC, Gosden CM, Bellingham AJ. Mean red cell volume in normal, anemic, small, trisomic and triploid fetuses. *Fetal Ther.* 1989;4(1):1-13.
- [6] Nicolaides KH, Thilaganathan B, Mibashan RS. Cordocentesis in the investigation of fetal erythropoiesis. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Nov;161(5):1197-200.
- [7] Takagi K, Tanaka H, Nishijima S, Masaoka N, Miyake Y, Sakata H, et al. Fetal blood values by percutaneous umbilical blood sampling. *Fetal Ther.* 1989;4(2-3):152-60.

- [8] Forestier F, Daffos F, Catherine N, Renard M, Andreux JP. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood*. 1991 Jun 1;77(11):2360-3.
- [9] Boulot P, Cattaneo A, Taib J, Peray P, Lefort G, Hedon B, et al. Hematologic values of fetal blood obtained by means of cordocentesis. *Fetal Diagn Ther*. 1993 Sep-Oct;8(5):309-16.
- [10] Tannirandorn Y, Uerpaiojkit B, Manotaya S, Tanawattanacharoen S, Danthamrongkul V, Charoenvidhya D. Fetal hematology. *J Med Assoc Thai*. 1999 Jun;82(6):598-603.
- [11] Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ, Jr., et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med*. 2000 Jan 6;342(1):9-14.
- [12] Fucharoen S, Winichagoon P. Thalassemia in SouthEast Asia: problems and strategy for prevention and control. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992 Dec;23(4):647-55.
- [13] Lorey F, Charoenkwan P, Witkowska HE, Lafferty J, Patterson M, Eng B, et al. Hb H hydrops foetalis syndrome: a case report and review of literature. *Br J Haematol*. 2001 Oct;115(1):72-8.
- [14] Li D, Liao C, Li J, Xie X, Huang Y, Wu Q. Hemoglobin H hydrops fetalis syndrome resulting from the association of the α -SEA deletion and the α Quong Szea mutation in a Chinese woman. *Eur J Haematol*. 2005;75:259-61.
- [15] Lie-Injo LE, Solai A, Herrera AR, Nicolaisen L, Kan YW, Wan WP, et al. Hb Bart's level in cord blood and deletions of alpha-globin genes. *Blood*. 1982 Feb;59(2):370-6.
- [16] Zhao W, Zhang J, Wang NS, Deng P. The relationship between Hb Bart's levels in cord blood and the deletions of alpha-globin genes. *Hemoglobin*. 1988;12(5-6):519-27.
- [17] Kyriacou K, Kyrii A, Kalogirou E, Vasiliades P, Angastiniotis M, Ioannou PA, et al. Hb Bart's levels in cord blood and alpha-thalassemia mutations in Cyprus. *Hemoglobin*. 2000 Aug;24(3):171-80.
- [18] Rugless MJ, Fisher CA, Stephens AD, Amos RJ, Mohammed T, Old JM. Hb Bart's in cord blood: an accurate indicator of alpha-thalassemia. *Hemoglobin*. 2006;30(1):57-62.

Identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses using Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery: Preliminary report

Kasemsri Srisupundit MD*, Wirawit Piyamongkol MD*,
Theera Tongsong MD*

* Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai

Abstract

Objective: To determine the sensitivity and specificity of Middle Cerebral Artery-peak systolic velocity (MCA-PSV) for identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses in mid-pregnancy gestation.

Study design: Diagnostic test

Material & Method: A total of 49 pregnant women (50 fetuses) which are couple at risk of homozygous alpha thalassemia-1, undergoing MCA-PSV measurement before performing cordocentesis at 18-22 weeks of gestation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were recruited into the study. The final diagnoses used as gold standard were based on fetal hemoglobin typing using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The main outcome measure was the sensitivity and specificity of MCA-PSV to identification homozygous alpha thalassemia-1 fetuses.

Results: Of 49 pregnant women recruited into the study, the mean age was 30.41 ± 4.7 years, the mean gestational age was 29.2 ± 5.3 weeks, the incidence of homozygous alpha thalassemia-1 was 24% (12 from 50 fetuses). If using MCA-PSV above 1.5 Multiple of Median (MoM) as a cut off point, the sensitivity of MCA-PSV to detection homozygous alpha thalassemia-1 fetuses was 91.67% (11 from 12 cases), specificity was 100%, the positive predictive value and negative predictive value of MCA-PSV were 100% and 97.43% respectively. There is one case of homozygous alpha thalassemia-1 but has normal MCA-PSV.

Conclusion: MCA-PSV is a useful method in mid-pregnancy gestation to identify homozygous alpha thalassemia-1 fetuses with very high sensitivity and specificity, and may reduce risk from unnecessary cordocentesis in some fetuses.

Keywords: Homozygous alpha thalassemia-1, Middle Cerebral Artery – peak systolic velocity (MCA-PSV)

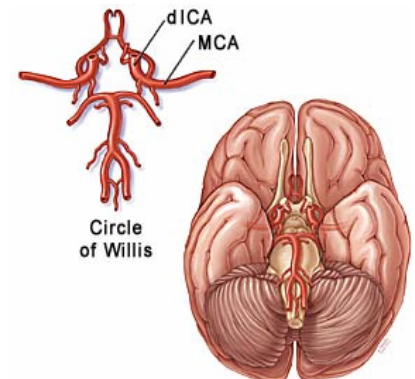
Identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses using Doppler waveform index of Middle Cerebral Artery: Preliminary report

Kasemsri Srisupundit MD*,
Wirawit Piyamongkol MD*,
Theera Tongsong MD*

* Department of Obstetrics and
Gynecology, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai



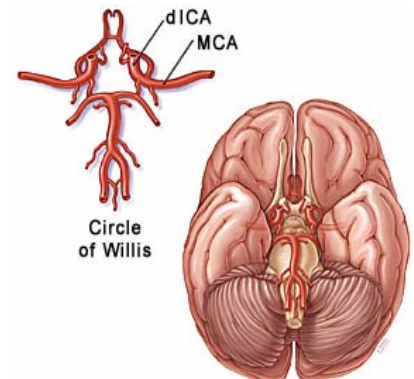
- **Middle Cerebral Artery-Peak Systolic Velocity (MCA-PSV)**
→ fetal anemia (Rh isoimmunization)
- **MCA-PSV & homozygous alpha thalassemia-1 (Hb Bart's disease) fetus**
→ limited data





Objective

- To determine the **sensitivity and specificity** of MCA-PSV for identification of homozygous alpha thalassemia-1 fetuses in mid-pregnancy gestation
- Study design : **diagnostic test**
- May – October 2007





Material & Method

49 pregnant women (**50 fetuses**), 18-22 wks,
couple at risk of homozygous alpha
thalassemia-1



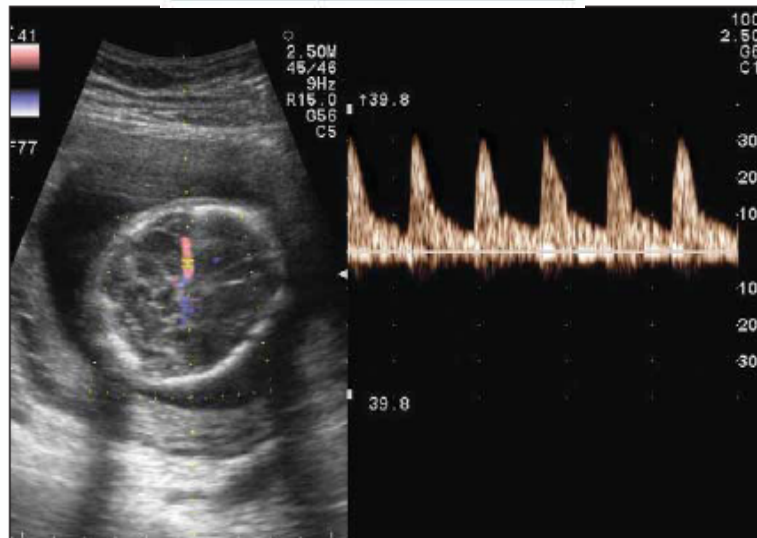
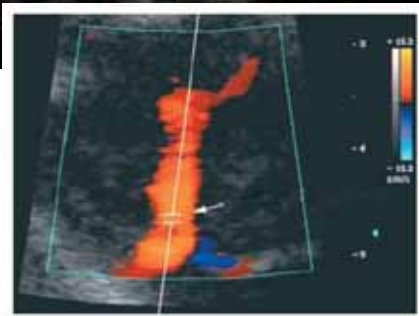
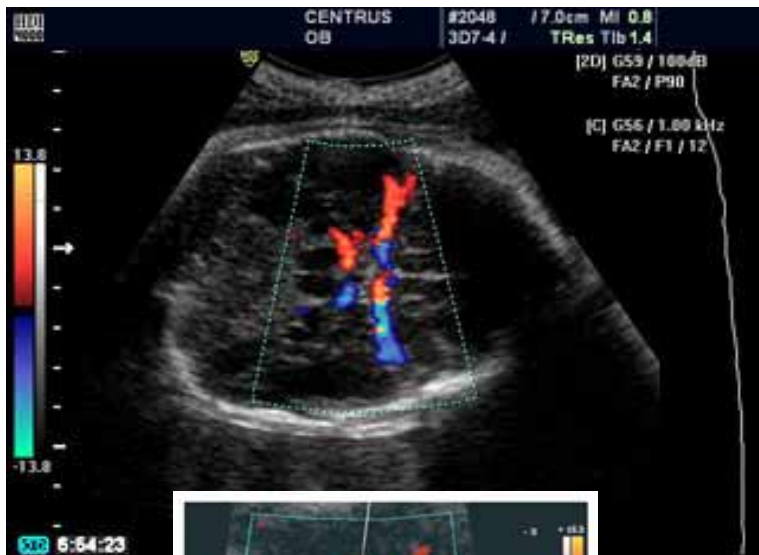
MCA-PSV measurement



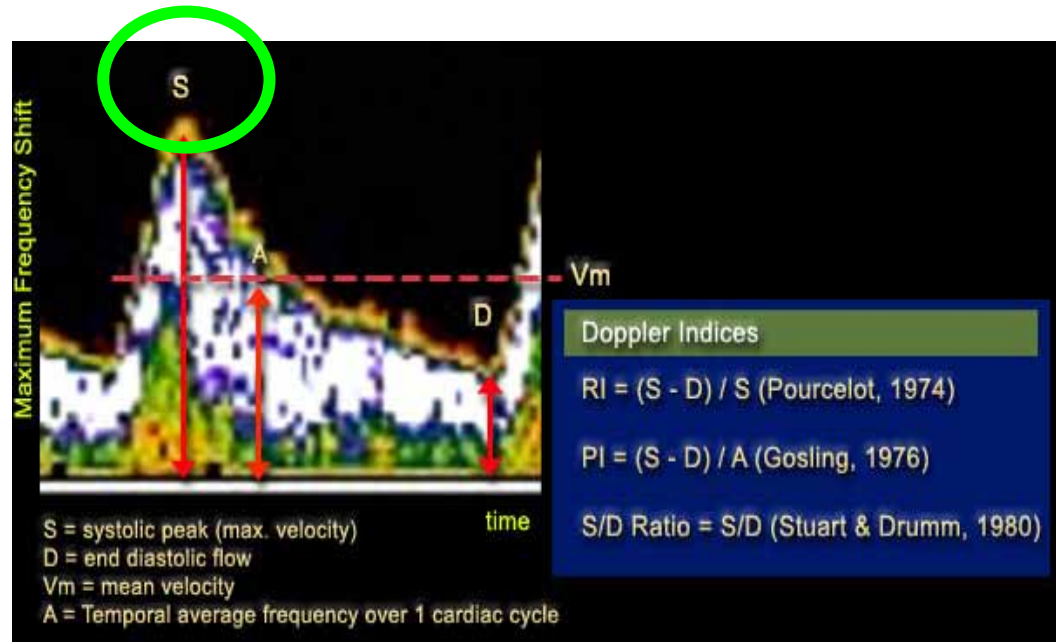
Cordocentesis (fetal Hb typing)
High Performance Liquid Chromatography technique
(**HPLC**)



Maharaj Nakorn Chiangmai Hospital



PSV



Middle Cerebral Artery



Main outcome measurement

Sensitivity

Specificity

Positive predictive value

Negative predictive value



MCA-PSV

Cut off point : MCA-PSV > 1.5 Multiple of Median (MoM)

Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity of Healthy Fetuses in the First Half of Pregnancy

*Theera Tongsong, MD, Chanane Wanapirak, MD,
Supatra Sirichotiyakul, MD, Fuanglada Tongprasert, MD,
Kasemsri Srisupundit, MD*

Table 1. Nomogram of Predicted MCA PSV at the 5th, 10th, 50th, 90th, and 95th Percentiles and 1.5 MOM for Each Gestational Age (GA)

GA, wk	MCV PSV, cm/s					1.5 MOM
	5th	10th	50th	90th	95th	
11	3.2	5.2	10.7	15.2	19.5	16.1
12	4.5	6.5	12.1	16.9	21.2	18.2
13	5.8	7.8	13.6	18.5	22.8	20.3
14	7.1	9.0	15.0	20.2	24.5	22.4
15	8.4	10.3	16.4	21.8	26.1	24.5
16	9.8	11.5	17.8	23.4	27.7	26.7
17	11.1	12.8	19.2	25.1	29.4	28.8
18	12.4	14.1	20.6	26.7	31.0	30.9
19	13.7	15.3	22.0	28.3	32.6	33.0
20	15.0	16.6	23.4	30.0	34.3	35.1
21	16.4	17.8	24.8	31.6	35.9	37.2
22	17.7	19.1	26.2	33.3	37.6	39.3

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	101.8*	---	1.13	4829406
Ao	---	8.7	2.44	458912

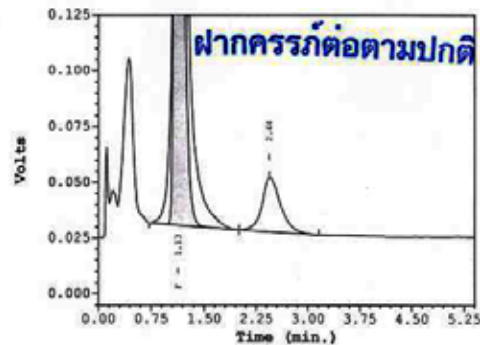
Total Area: 5,288,318*

F Concentration = 101.8* %

A2 Concentration = %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments: **Normal typing**



Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
F	96.4*	---	1.13	4850404
Ao	---	13.2	2.39	740072
A2	0.4*	---	3.56	20034

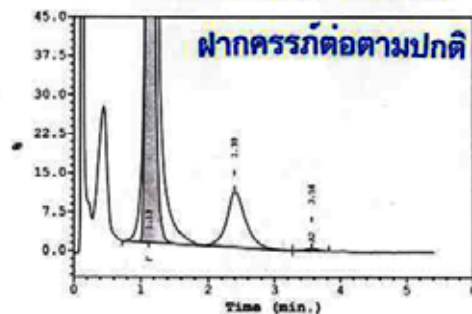
Total Area: 5,610,510*

F Concentration = 96.4* %

A2 Concentration = 0.4* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments: **α -Thal. 1 trait**



Gold standard test

Fetal Hb typing

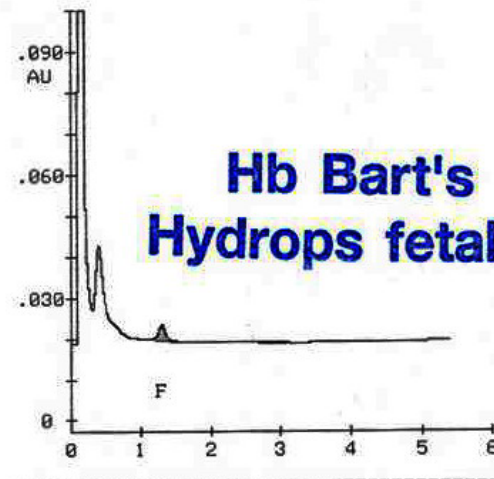
(HPLC)

VIAL# 0
SAMPLE ID# 0000000000000005652

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	98.2	1.29	26619
Ao	9.8	2.56	2892

TOTAL AREA 29511

F 98.2% A2 0.0%





Result





Result

- **50** fetuses
- Mean maternal age **29.2** $\pm$ 5.3 (15-44) years
- Mean gestational age **19** $\pm$ 1 (18-22) weeks
- Fetal Hb typing
 - **Hb Bart's** : **12** cases
 - alpha thalassemia-1 trait : 21 cases
 - normal (alpha thal-1 gene) : 16 cases
 - non Bart's (incomplete data) : 1 case



HPLC

Hb Bart's non Bart's

MCA-PSV

> 1.5 MoM

≤ 1.5 MoM

11	0
1	38

11

39

12

38

fetuses

2 x 2 table



- Sensitivity **91.67%**
- Specificity **100%**
- Positive predictive value **100%**
- Negative predictive value **97.43%**





Discussion



Discussion

- **Hb Bart's disease** : most common cause of hydrops fetalis in Thailand
- MCA-PSV & Hb Bart's disease : **limited data**
- Leung WC et al, 2002 (Canada) 4 fetuses



- **In this study (12 Hb Bart's fetuses): MCA-PSV has very high sensitivity & specificity (92% and 100%)**
- **One case** of Hb Bart's fetus with negative MCA-PSV (32.6 cm/sec)
- **One case** of fetal anemia (HbHCS) with negative MCA-PSV (32.9 cm/sec)
- **Clinical application : reduce unnecessary cordocentesis in some fetuses**



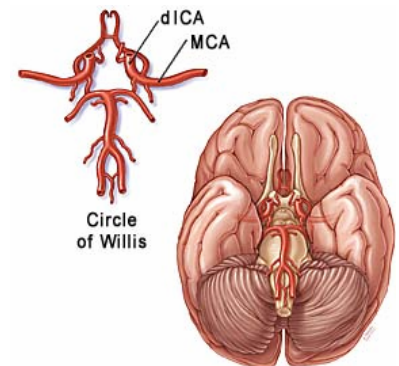
- **Limitation**
- **Bias** from sonographic finding in fetuses with Hb Bart's (cardiomegaly, increase amniotic fluid)
 - all cases of increase MCA-PSV have signs of hydropic change
- **Trained** & experienced sonographers





Conclusion

- **MCA-PSV** : useful method in mid-pregnancy gestation to identify homozygous alpha thalassemia-1 fetuses
- Very **high** sensitivity and specificity
- **Reduce** risk from unnecessary cordocentesis in some fetuses



Acknowledgement

- **Professor Jatupol Srisomboon**

Head department of Obstetrics and Gynecology,
Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital

Faculty of medicine, Chiang Mai University

- **Thailand Research Fund (TRF)**



คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โรงพยาบาลมหาราชันนครเชียงใหม่

Thank you for your attention

MFM Team



- **Accuracy of test 98%**
- **Prevalence of disease 24%**
- **False positive rate 0%**
- **False negative rate 8.3%**