

Screening tests for inherited hemoglobin disorders in pregnancies: Results from King Chulalongkorn Memorial Hospital

Nara Paritpooke* Jamsai Suwansaksri**

Viroj Wiwanitkit* Atchasai Siritantikorn*

Paritpooke N, Suwansaksri J, Wiwanitkit V, Siritantikorn A. Screening tests for inherited hemoglobin disorders in pregnancies: Results from King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Chula Med J* 1999 Sep; 43(9): 645-53

Objective : *To study screening tests for inherited hemoglobin disorders in pregnancies.*

Setting : *King Chulalongkorn Memorial Hospital.*

Design : *Prospective study.*

Subjects : *One hundred and fourteen pregnant women who received antenatal laboratory check ups in the Out-Patient Division, King Chulalongkorn Memorial Hospital during April, 1998.*

Methods : *EDTA blood specimens from each subject were analyzed by three methods in order to screen for inherited hemoglobin disorders. Hemoglobin electrophoresis was set as the standard method. One-Tube Osmotic Fragility (OF) test combined with a Dichlorophenol-indolphenol (DCIP) test using a KCU-DCIP-clear Reagent Kit were used as one test screening method. The other test method was blood indices investigation (MCV and MCH) performed by an automated hematology analyzer.*

Results : *The sensitivity and specificity of using the OF test combined with the DCIP test were 100 and 95 % respectively. While the sensitivity and specificity of using criteria of low abnormal mean corpuscular volume (MCV) and mean*

* Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

**Department of Clinical Chemistry, Faculty of Allied Health Science, Chulalongkorn University

corpuscular hemoglobin (MCH) were 72.2 and 67.9 % respectively. False positive and false negative results (3.5 % and 0 %) of using OF plus DCIP test were less than when using low abnormal MCV and MCH (21.9 and 8.7% respectively). The incidence of inherited hemoglobin disorders in this study was 31.6 %.

Conclusions : *The OF plus DCIP is the preferred method to help screen for abnormal hemoglobin in the pregnant women. It is convenient to use, easy and inexpensive when compared to standard hemoglobin electrophoresis. This method should be added to current antenatal check-up programs.*

Key words : *Screening test, Inherited hemoglobin disorders, Pregnancy.*

Reprint request : Paritpokee N, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. March 10, 1999.

นารา ปรินทิ, แจ่มใส สุวรรณศักดิ์ศรี, วิโรจน์ ไวกานิชกิจ, อัชฌาศัย สิริตันติกร. การตรวจคัดกรองโรคความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ของฮีโมโกลบินในสตรีตั้งครรภ์ ผลการศึกษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2542 ก.ย; 43(9): 645-53

- วัตถุประสงค์** : เพื่อศึกษาคุณสมบัติของการตรวจคัดกรองโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินในสตรีตั้งครรภ์
- สถานที่ทำการศึกษา** : โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- รูปแบบการศึกษา** : การศึกษาเชิงพรรณนาแบบย้อนหลัง
- ตัวอย่างที่ทำการศึกษา** : สตรีตั้งครรภ์ที่รับบริการการตรวจทางห้องปฏิบัติการการแพทย์ในการฝากครรภ์ ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือนเมษายน 2541 จำนวน 114 คน และวิธีมาตรฐานการตรวจแยกฮีโมโกลบินด้วยไฟฟ้า ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- วิธีการศึกษา** : นำตัวอย่างเลือดที่ผสมกับสาร EDTA ไปตรวจวิเคราะห์เพื่อกรองโรคความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ของฮีโมโกลบิน โดยใช้วิธีการตรวจแยกฮีโมโกลบินด้วยไฟฟ้าเป็นวิธีมาตรฐานวิธีตรวจคัดกรองที่ทำการศึกษาวีธีแรกคือ การตรวจวัดความแปรปรวนของเม็ดเลือดร่วมกับวิธีตรวจดีซีไอพี โดยน้ำยาสำเร็จรูปวิธีที่ทำการศึกษาก็วิธีหนึ่งคือการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (ค่าเฉลี่ยปริมาตรของเม็ดเลือดแดง และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางโลหิตวิทยา
- ผลการศึกษา** : ความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจวัดความแปรปรวนของเม็ดเลือดร่วมกับวิธีตรวจดีซีไอพี โดยน้ำยาสำเร็จรูป เท่ากับ 100 และ 95 % สำหรับความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงโดยใช้ค่าที่ต่ำเป็นเกณฑ์ตัดสิน เท่ากับ 72.2 และ 67.9 % นอกจากนี้พบว่าผลบวกปลอมและผลลบปลอมของวิธีการตรวจวัดความแปรปรวนของเม็ดเลือดร่วมกับวิธีตรวจดีซีไอพี (3.5 และ 0 %) มีค่าต่ำกว่าวิธีการตรวจหาค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (21.9 และ 8.7 %) จากการศึกษาพบอุบัติการณ์ความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ของเม็ดเลือดแดง 31.6 %

- สรุป** : วิธีการวัดความเปราะบางของเม็ดเลือดร่วมกับวิธีตรวจดีซีไอพี สำเร็จรูปสามารถใช้เป็นวิธีการตรวจคัดกรองโรคความผิดปกติทางพันธุกรรมของฮีโมโกลบินในสตรีตั้งครรภ์ที่สะดวก ง่าย และเสียค่าใช้จ่ายน้อยสมควรที่จะเพิ่มการตรวจคัดกรองโรคชนิดนี้ในแผนการตรวจฝากครรภ์ตามปกติ
- คำสำคัญ** : การตรวจคัดกรองโรค, ความผิดปกติทางกรรมพันธุ์ของฮีโมโกลบิน, การตั้งครรภ์

Inherited hemoglobin disorders are common anemic blood diseases. The two major types of these disorders are Thalassemia and Hemoglobinopathy. Thalassemia results from incomplete synthesis of globin chains while Hemoglobinopathy results from structural abnormality of synthesized globin chains. Thalassemia and Hemoglobinopathy are the most common genetic diseases in Thailand. In Thai populations, the rate of alpha Thalassemia, beta Thalassemia, Hemoglobin E (HbE) and Hemoglobin Constant Spring (HbCS) are 2 - 30%, 3 - 9%, 13 - 52% and 4 - 5% respectively.⁽¹⁻⁴⁾ These genetic abnormalities cause many systemic effects. Due to the aberrant fragile red blood cell, chronic hemolytic anemia is the result. Limitations of normal daily activity, jaundice, hepatosplenomegaly, osteoporosis and facial abnormalities are common.

Presently 500,000 Thai people suffer from these diseases - 12,000 people are in the neonatal group with approximately 1.2 % of total newborn in each year so effected.⁽⁵⁾ Therefore, Thalassemia and Hemoglobinopathy are major health problems for Thailand. This problem affects not only public health but also the economy of the country. If there is no method for controlling and prevention, the number of patients and carriers will increase and social problems will be the result.⁽⁶⁻⁷⁾ Screening tests for abnormal genes (heterozygous and homozygous genotypes), health education and genetic counseling are effective methods to assist in coping with this problem.

Regarding geographical distribution of these diseases, they are most common in the Northeastern region of Thailand.⁽⁸⁻¹²⁾ But since Bangkok is the capital city and center of education and economics,

immigration to Bangkok must be considered. Screening test results for Thalassemia and Hemoglobinopathy among Northeastern immigrants in Bangkok are very interesting.

King Chulalongkorn Memorial Hospital is a large hospital in Bangkok. Many pregnant women get health services from this hospital every day. This study was designed to determine the demographic data and hematological test results of pregnant women and to compare simple methods in screening for inherited hemoglobin disorders to standard method in order to determine the most effective and economical method for a screening tests. Furthermore, the results of this study can be useful a good data from further study.

Materials and Methods

The subjects in this study were 114 pregnant women who received routine antenatal laboratory screening test check-ups in the Out-Patient Division of King Chulalongkorn Memorial Hospital during April 1998.

Subject blood specimens were collected in EDTA tubes and then analyzed in the following categories. Blood indices were investigated using an automated analyzer-Coulter STKS. Screening tests using a One -Tube Osmotic Fragility (OF) test⁽¹³⁾ combined with a Dichlorophenol-indolphenol (DCIP) test using KKU-DCIP-clear Reagent Kit⁽¹⁴⁾ were performed. Hemoglobin typing was determined by cellulose acetate electrophoresis (Helena Laboratory, Beaumont, Texas) as the standard test. The results from each category were collected and analyzed using descriptive statistical analysis when appropriate.

Results

Blood indices for all subjects from the automated hematology analyzer are presented in Table 1. There were 11 positive and 103 negative results from the OF test and there were 38 positive and 76 negative results from KKU-DCIP test. There were 36 (31.6 %) subjects who had abnormal hemoglobin electrophoresis results (Table 2). The results of hemoglobin electro-

phoresis categorized by the OF and DCIP tests are shown in Table 3. When using criteria of abnormal low mean corpuscular volume: MCV (< 80 femtoliter) and mean corpuscular hemoglobin: MCH (< 27 picogram) of automated hematology (Table 4), sensitivity and selectivity was poorer than when using the OF test and DCIP screening (Table 5)

Table 1. Blood indices from automated analyzer.

	Hemoglobin (gram/deciliter)	Hematocrit (%)	Mean corpuscular volume (femtoliter)	Red blood cell distribution width(%)	Mean corpuscular hemoglobin(picogram)
Mean	11.37	33.84	83.38	13.70	28.40
Standard deviation	1.14	3.34	8.91	1.22	3.40
Maximum	13.80	41.80	99.20	18.10	33.90
Minimum	8.80	26.70	60.60	11.80	13.90

Table 2. Results of hemoglobin electrophoresis.

Patterns*	Number	Valid percentage (%)
A ₂ A	78	68.4
EA (Hb E trait)	26	22.8
EE (Homozygous Hb E)	10	8.8

* pattern identified by comparison with control.

Table 3. Hemoglobin electrophoresis patterns compared to results of Osmotic Fragility test (OF) and Dichlorophenol- indolphenol test (DCIP).

Result of OF	Result of DCIP	Number (percentage)	Hemoglobin electrophoresis patterns		
			EE	EA	A ₂ A
+	+	9 (7.9 %)	9	0	0
+	-	2 (1.8 %)	0	0	2
-	+	29 (25.4 %)	1	26	2
-	-	74 (64.9 %)	0	0	74

Table 4. Hemoglobin electrophoresis patterns compared to criteria of abnormal mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH).

MCV* (femtoliter)	MCH** (picogram)	Number (percentage)	Hemoglobin electrophoresis patterns		
			EE	EA	A ₂ A
+	+	32 (28.1 %)	9	12	11
+	-	1 (0.9 %)	1	0	0
-	+	8 (7 %)	0	4	4
-	-	73 (64 %)	0	10	63

* + mean MCV < 80 femtoliter

** + mean MCH < 27 picogram

Table 5. Comparison of sensitivity and specificity of screening tests using Osmotic Fragility (OF) test combined with Dichlorophenol - indolphenol (DCIP) test and screening tests using criteria of abnormal low mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH).

Screening tests	Sensitivity (%)	Specificity (%)	False positive (%)	False negative (%)
OF and DCIP	100	95	3.5	0
MCV and MCH	72.2	67.9	21.9	8.7

Discussion

From this study, the mean hemoglobin level of the subjects was 11.37 gram/deciliter. This hemoglobin level was not considered anemia,⁽¹⁵⁾ but in hemoglobin electrophoresis, 31.6 % of the total subjects had abnormal hemoglobin electrophoresis results. All abnormal results found were Hb E trait and Homozygous Hb E. No other hemoglobin abnormalities were found. Hb E is the most common inherited hemoglobin disorder in Thailand⁽¹⁻⁴⁾ and the incidence of Hb E in this study matches previous data where the incidence was about 13 - 52 %. Improving their conditions is another problem that should be addressed. The rather high rate of Hb E may be due to immigration of people from epidemic area to Bangkok.

Immigration can result in epidemiological changes of disease in other areas.⁽¹⁶⁾ Therefore, methods of controlling carriers of disease to settle in specific areas, and good methods for screening in instances when immigration cannot be controlled are very important.

In this study, screening methods for inherited hemoglobin disorders were evaluated. The OF test is mainly used for Thalassemia screening. Therefore, combining it with the DCIP test, and which is used for Hemoglobinopathy screening, is a method which can be used for inherited hemoglobin diseases screening. These diseases can be also found in cases with hypochromic microcytic red cells detected by an automated hematology analyzer.⁽¹⁷⁾ Although both methods (of test and DCIP test) can be used for

inherited hemoglobin disorder screening, from this study using OF and DCIP as the screening test resulted in sensitivity of 100 % and specificity of 95 %. While using criteria of abnormal MCV and MCH, sensitivity and specificity were lower and false positive and false negative results are higher. A combination of the two criteria decreased both sensitivity and specificity. From this fact, there is an implication that MCV and MCH detection is a less efficient screening test for inherited hemoglobin disorders than a combination of the OF and DCIP tests.

A screening method by using OF and DCIP tests is also in consonance with the concept of present health economics⁽¹⁸⁾ as the cost of this method is much cheaper than the standard hemoglobin electrophoresis method. There is also considerable convenience in using this method - many local made kits have been produced such as the KKU -DCIP - Clear Reagent Kit. And methods to collect blood specimen are convenient because both capillary and venous blood specimens give no statistical difference in the test results.⁽¹⁹⁾ Therefore, problem about complication of specimen collection procedures are decreased. Furthermore, from this study, no false negative results were found (the sensitivity was 100 % by OF plus the DCIP screening test.) The conclusion is that this combined method can be a good screening test for inherited hemoglobin disorders among pregnant women. But since false positive test results can result from other anemias or normal stages, peripheral blood smear examination should be added if there is abnormal result.⁽⁹⁾ All false positive results in this study might be due to iron deficiency anemia but which was detected by blood smear examination and red cell indices.

The standard method used in this study is hemoglobin electrophoresis not including to micro-column chromatography. Therefore, it is unable to determine the valid percentage of A_2 composition in case of genotype A_2A . However, all samples with genotype A_2A seemed normal figure when compared to the standard normal control at the same run and recheck by blood smear examination. Therefore, further study to determine actual incidence of inherited hemoglobin diseases in the hospital by definite diagnostic method as DNA identification is recommended.

This study is a prospective study, therefore, case selection bias can be controlled. From this study, the addition of OF and DCIP tests to routine antenatal check-ups is recommended. It appears to be equally useful when compared with other new tests such as the triple and quadruple tests.

Conclusions

Using combined OF and DCIP tests can help to effectively screen for abnormal hemoglobin in pregnant woman. It is convenient to use, easy and not expensive to perform when compared to the standard hemoglobin electrophoresis method.

References

1. Wasi P, Pootrakul S, Pravatmaung P, Winichagoon P, Fucharoen S. Thalassemia in Thailand. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 344: 352 - 63
2. WHO Working Group. Community control of hereditary anemias: memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1983; 61(1): 63-80
3. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia: molecular biology and

- clinical medicine. Hemoglobin 1997 Jul; 21(4): 299-319
4. คณะกรรมการประเมินสถานการณ์โรคธาลัสซีเมีย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. สถานการณ์ปัจจุบันและกลวิธีในการป้องกันและควบคุมโรคเลือดในประเทศไทย. 1989 -1990. กรุงเทพฯ : กระทรวงสาธารณสุข, 2533:1-43
 5. สุทัศน์ พุเจริญ. เอกสารเสนอในการประชุมคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญโรคธาลัสซีเมียของกระทรวงสาธารณสุข, 2532.
 6. วิจารย์ พานิช. แนวทางแก้ปัญหาโรคธาลัสซีเมียในประเทศไทย. แพทยสมาคม 2532 ก.ค. - ก.ย.: 18(3):67-74
 7. วิจารย์ พานิช. หมออนามัยกับการป้องกันโรคเลือดจางธาลัสซีเมีย. วารสารอนามัย 2535 ก.ค. - ส.ค.; 2(1):25-31
 8. Fuchareon S, Winichagoon P, Thonglairoam W. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand: experience from 100 pregnancies. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991 Mar; 22(1): s 16-29
 9. บพิธ สรสิทธิ์. การตรวจคัดกรองหาพาหะของธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติในสตรีมีครรภ์ ณ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ด้วยวิธีอย่างง่าย. วารสารการแพทย์กลุ่มเครือข่าย 6/2 2540 มิ.ย. - ก.ย.; 5(2):81-8
 10. Flatz G, Pik C, Sringam S. Hemoglobin E and Thalassemia. Their distribution in Thailand. Ana Hum Genet 1965 Nov; 29(2): 151-70
 11. Na-Nakorn S, Wasi P. Alpha-thalassemia in Northern Thailand. Am J Hum Genet 1970 Nov; 22(6): 645-51
 12. Wasi P, Na-Nakorn S, Suingdumrong A. Studies of distribution of hemoglobin E, Thalassemias and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in north-eastern Thailand. Nature 1967 Apr; 214(87): 501-2
 13. Kattamis C, Efremov G, Pootrakul S. Effectiveness of one tube osmotic fragility screening in detecting beta-thalassemia trait. J Med Genet 1981 Aug; 18(4): 266-70
 14. สุพรรณ ภูเจริญ, ณัฐยา แซ่อึ้ง, กนกวรรณ แสนไชยสุริยา, เกียรติกร กิจเจริญ, กุลนภา พุเจริญ. KKU-DCIP-Clear: ชุดน้ำยาตรวจกรอง Hb E อย่างง่ายและรวดเร็ว. การประชุมสัมมนาวิชาการเรื่องการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมีย ครั้งที่ 14, คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 21-22 พฤศจิกายน 2539.
 15. Scott DE, Pritchard JA. Anemia in pregnancy. Clin Perinatol 1974 Sep; 1(2): 491 - 506
 16. Flint J, Harding RM, Clegg JB, Boyce AJ. Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by analysis of globin gene variants. Hum Genet 1993 Mar; 91(2): 91-117
 17. มานิต หงสวินตกุล. Thalassemia/Hemoglobinopathy in pregnancy, clinical significance of Hb level and MCV in relation to Hb typing. วารสารการแพทย์กลุ่มเครือข่าย 6/2 2538 ก.พ. - พ.ค. ; 3(1): 7-18
 18. อุกฤษ รุจิระการโชติกุล. เศรษฐศาสตร์การบริหารงานห้องปฏิบัติการ. วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 2540; 30 Suppl 1: S108-10
 19. Sangkitporn S, Kanapongsa S. Development of screening method for criterias of thalassemia and abnormal hemoglobins. J Med Tech Assoc Thai 1997 Jun; 25 (1): 59-64