

Prenatal Diagnosis of Homozygous Alpha-Thalassemia-1 of Southeast Asian Type by Polymerase Chain Reaction

Kitti Torcharus, Aphornpirom Ketupanya*, Thip Sriphaisal, Trirote Krutvecho, Rachata Lumkul
Chamaiporn Suwanasophon

Division of Hematology, Department of Pediatrics, *Department of Obstetrics and Gynecology, Pramongkutklao
College of Medicine, Bangkok, Thailand

Abstract: The association of Hemoglobin Bart's (Hb Bart's) hydrops fetalis or homozygous α -thalassemia of Southeast Asian type is very common in Southeast Asia especially in Thailand. Because of the fact that the pregnancy may be complicated by toxemia, ante- or post-partum hemorrhage as well as psychological burden for the family and the mother who have to carry a nonviable fetus to term. The prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops is therefore justified so that the family can be given a choice of early termination of the pregnancy.

In order to identify the presence of Hb Bart's hydrops in the fetus, the collaboration study in 18 high risk pregnancies with Hb Bart's hydrops fetalis were undertaken between February 1993 and October 1996 at Obstetrics and Gynecology Department and the Hematology Division, Department of Pediatrics, Pramongkutklao Hospital and College of Medicine, Bangkok, Thailand.

Amniocentesis was done at 16-33 weeks of gestation. DNA analysis were performed by polymerase chain reaction (PCR) using 2 techniques, 1) three nucleotide primers and 2) four nucleotide primers. After either therapeutic abortion or birth, heart blood or cord blood was drawn to confirm diagnosis by Hb electrophoresis and DNA analysis. Of 18 high risk fetuses, 6 were recognized as Hb Bart's hydrops fetalis, 7 showed the alpha thal-1 trait, 1 showed alpha thal-2 trait and 4 were normal fetus. The technique was entirely suitable for prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis. This technique was rapid, simple non-radioactive method, less expensive and available in most PCR laboratories.

Key Words: • Thalassemia • Bart's hydrops fetalis • Prenatal diagnosis • Polymerase chain reaction
Thai J Hematol Transf Med 1997;7:173-7.

การวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดชนิดโฮโมซัยกัสแอลฟาธาลัสซีเมีย-1 โดยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

กิตติ ต่อจรัส อารณภรณ์มัย เกตุปัญญา* ทิพย์ ศรีไพศาล ไตรโรจน์ คุรุเวช รัชฎะ ลำกุล และ
ชาไมพร สุวรรณโสภณ

หน่วยโลหิตวิทยา กองกุมารเวชกรรม *กองสูติรีเวชกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

บทคัดย่อ: ฮีโมโกลบินบาร์ทส์หรือฟีตัลลิสพบได้บ่อยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มารดาที่ตั้งครรภ์จะพบภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญได้แก่ ภาวะครรภ์เป็นพิษ ตกเลือดก่อนและหลังคลอด และสภาพจิตใจที่เป็นทุกข์ที่คลอดบุตรออกมาเสียชีวิต การวินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดและการยุติการตั้งครรภ์สามารถป้องกันโรคนี้ได้

คณะผู้รายงานได้วินิจฉัยทารกในครรภ์ก่อนคลอดในหญิงตั้งครรภ์ที่เสี่ยงต่อโรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์หรือฟีตัลลิสจำนวน 18 รายอายุครรภ์ ระหว่าง 16-33 สัปดาห์โดยการตรวจน้ำคร่ำและวิเคราะห์ดีเอ็นเอของทารกโดยวิธีเพิ่มปริมาณยีน (โพลีเมอร์เชนรีแอกชัน) ผลการวินิจฉัยพบว่า เป็นโรคฮีโมโกลบินบาร์ทส์หรือฟีตัลลิส 6 ราย ปกติ 4 ราย เป็นพาหะ ของแอลฟาธาลัสซีเมีย-1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย-2 เท่ากับ 7 และ 1 รายตามลำดับ เทคนิคที่ใช้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอทั่วไปเนื่องจากรวดเร็ว ประหยัด และปลอดภัยเพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี

Key Words: • Thalassemia • Bart's hydrops fetalis • Prenatal diagnosis • Polymerase chain reaction
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2540;7:173-7.

-
- ได้รับต้นฉบับเมื่อ 26 สิงหาคม 2540 พิจารณาให้ลงพิมพ์เมื่อ 15 กรกฎาคม 2540
 - ติดต่อขอสำเนาต้นฉบับได้ที่ รศ.พ.กิตติ ต่อจรัส หน่วยโลหิตวิทยา กองกุมารเวชกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า 315 ถ.ราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

Hemoglobin (Hb) Bart's hydrops fetalis is a lethal condition, invariably complicated by serious maternal complications¹⁻³. It is due to homozygous alpha thalassemia-1 (- - SEA/- - SEA), in which all four alpha thalassemia genes are deleted⁴. Hb Bart's hydrops fetalis is the most common cause of late fetal loss in Southern Chinese, Filipinos, and other Southeast Asian. Alpha thalassemia-1 carrier (trait) is common in Thailand. Its prevalence is 3.5% in Bangkok⁵ and up to 14 % in Northern Thailand (Chiengmai)⁶, giving an expected homozygote incidence of 0.3 and 4.9 per thousand pregnancy in Bangkok and Chiengmai respectively.

Materials and Methods

Amniocentesis & DNA extraction

Eighteen high risk pregnancies for Hb Bart's hydrops fetalis were included in this study. To identify the presence of Hb Bart's hydrops fetalis, amniocentesis was performed under ultra-sound guidance at 16 and 33 weeks of the gestation. The amniocytic fluid of 15-20 mL was collected. The sample was then centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes. To identify the defective DNA, the precipitate that contained the amniocytes was extracted by 2 methods : 1). By heating amniocytes⁷ at 100°C for 2 minutes in 0.1 N NaOH 2M NaCl; 2). by phenol chloroform extraction.⁸ Parents' blood was extracted by phenol chloroform. DNA analysis for α -thalassemia-1 of Southeast Asian type was performed by three primers technique⁹. DNA analysis for rapid diagnosis of PND samples was done by four primers technique described by Chehab, et al¹⁰. The detail of each technique was described.

DNA analysis (three primers technique)

Amplification was achieved using the primers described by Winichagoon, et al.¹¹ The

three primers were A4: 5'-GGGGCGCCTTGGGGA GGTC-3' , A9: 5'-ATATATGGGTCTGGAAGT GTATC-3' and A1B: 5'-GTTCCCTGAGCCCCGA CACG-3'. The 20 μ l reaction mixture contains 0.2 μ g of DNA, 10 pmole of each primer (A4,A1B,A9), 40 μ mole of dNTPs and 0.5 unit Ampli Taq DNA polymerase in PCR buffer (10 mM Tris,pH 8.3/50 mM KC1/2.5 mM MgCl₂ 0.01%(w/v) gelatin). The 35 cycle reaction was performed in DNA Thermal Cycle (Perkin-Elmer Cetus). Before starting PCR reaction the DNA samples was denatured at 95°C for 5 minutes. In the subsequent cycle the samples was denatured at was 95°C for 1 minute, then cooled to 63°C for 2 minutes for annealing, and incubated at 72°C for 2 minutes for extension. The last cycle was 72°C for 7 minutes and 8 μ l of amplified DNA were electrophoreses in a 2.5% agarose gel at 100 volts then stained in ethidium bromide, and visualized on UV transilluminator. (Figure 1)

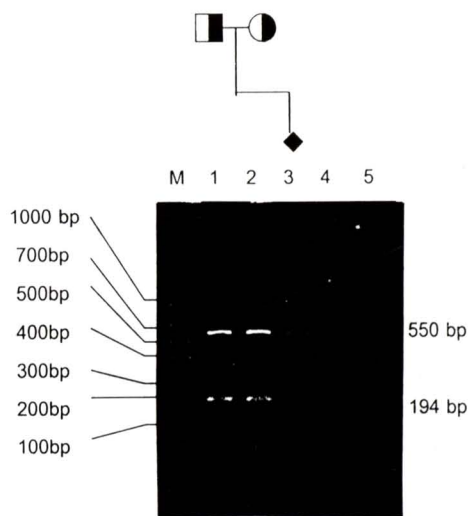


Figure 1. Photograph of ethidium bromides stain agarose gel electrophoresis of amplified DNA from a family at risk for Hb Bart's hydrops fetalis. Lane 1, and 2 represent father, and mother with α -thal-1 trait, lane 3 is PND fetus, lane 4 and 5 are Hb Bart's hydrops fetalis and normal control. M= DNA marker(GelMarker™), bp=base pair

DNA analysis (four primers technique)

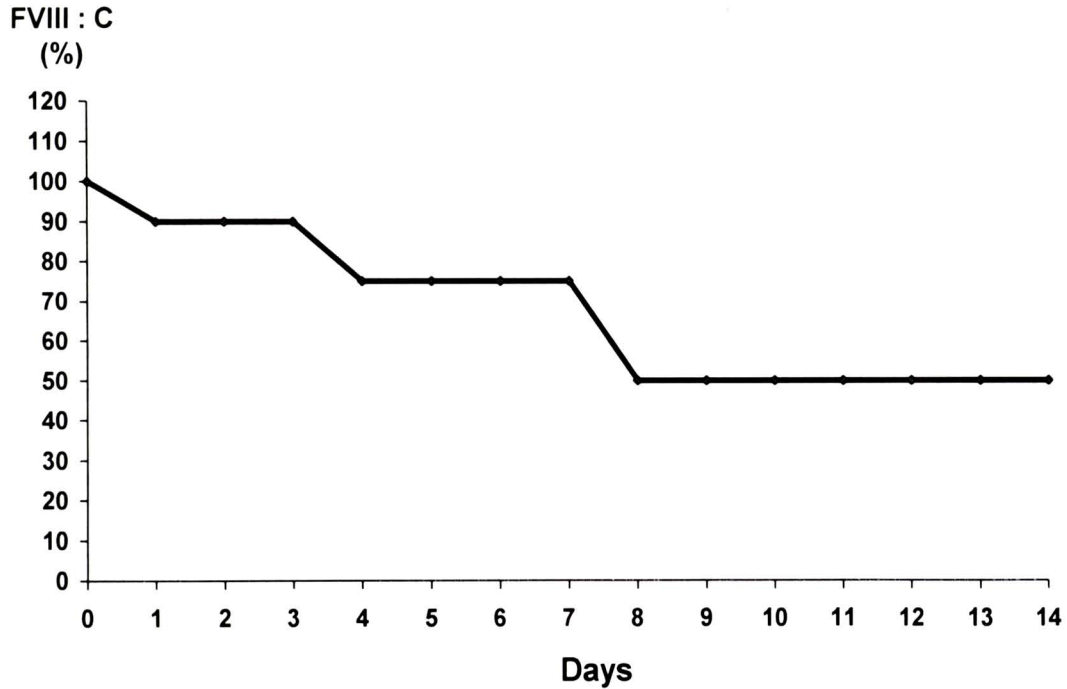
The four primers methods described by Chehab, et al¹⁰. The first pairs primer (A1: 5'-TACTGTAGATACCCGTGTACAA-3' and A2: 5'-ATCATGATGGAAACATAG TAAT-3') amplified 136 base pair (bp) region of α globin gene cluster. The second pair (P3: 5'-ACACAACGTGTGTTCACTAGC-3' and P4: 5'-CAACTTCATCCACGTT CACC-3') was added to the mixture to amplify a 110 bp segment of β globin gene cluster which served as a control. The 100 μ l mixtures contained 0.5 μ g of DNA, 50 pmole of each primer, 200 μ M of each dNTP s, 2.5 units AmpliTaq DNA polymerase in PCR buffer (10 mM Tris, pH 8.3/50 mM KCl/2.5 mM MgCl₂ 0.01% (w/v) gelatin). The first cycle was 92°C for 5 minutes 49°C for 1 minute 30 second, and 72°C for 1 minute, 30 seconds. The second to thirty sixth cycle were 92 °C, 49 °C and 72 °C for 1 minute, 1 minute 30 seconds, and 1

minute 30 seconds respectively. The last extension cycle was 72 °C, 10 minutes. The 8 μ L of amplified DNA was electrophoresed in a 2.5% agarose gel at 150 volts, stained in ethidium bromide, and visualized on UV transilluminator .

Results

Of 18 high risk fetuses, 6 were diagnosed as Hb Bart's hydrops fetalis that justified therapeutic abortion. Seven of them were α -thal1 trait, 1 case was α -thal2 trait and 4 were normal fetuses. The maternal gestation age which amniocentesis performed and hematologic data were described in table1. The diagnoses were all confirmed by hemoglobin electrophoresis and DNA analyses using 3 primers technique, after either therapeutic abortion or birth. There was no fetal loss nor complications in our study.

Table 1. Prenatal diagnosis of Hemoglobin Bart's hydrops fetalis



Discussion

Hb Barts' hydrops fetalis is a lethal condition with 100 percent fetal loss or still birth. The pregnancies are invariably complicated by serious pre or postnatal conditions such as pre or post partum hemorrhage, toxemia of pregnancy¹⁻³. The prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis can be obtained from chorionic villi biopsy and hybridization with α and ζ globin gene probe^{12,13}. However, the technique is tedious, time consuming and it involves the use of radioactive labeling probe. The application of a polymerase chain reaction (PCR) base protocol^{11,14,15} that can specifically detects the α -SEA deletion may soon supersede that of gene mapping.

All cases in this study were diagnosed by amniocentesis. Seven of them had previous hydrops fetuses caused by homozygous α -thal1 (patients 1,4,5,8,15,16 and 17), whereas the others 9 cases (patients 2,3,6,9,10,11,12,13 and 18) previously had hydrops fetuses of unknown causes. The 7 th and 14 th patients came in at late gestation age of 33 weeks in the former while the gestation age of the latter was undetermined. However the ultrasound showed hydropic with ascites and pericardial effusion. Amniocentesis was successfully performed. The amniotic and ascitic fluid was analysed for defective DNA. The diagnoses of homozygous α -thal-1 were obtained from these samples.

We recommend that parents should be identified for α -thal1 carrier by three primers technique. The prenatal diagnosis should be obtained first by four primers technique because it is very rapid and the DNA extraction from amniotic fluid by heating at 100°C for 2 minutes in 0.1N NaCl 2M NaCl. Whereas the phenol chloroform extraction and the three primers technique should

be performed for confirmation.

Acknowledgment

The authors wish to express their thanks to Dr Santa Ha-Upala for his kind review of the English version manuscript.

References

1. Liang ST, Wong VCW, So WWK, Ma HK, Chan V, Todd D. Homozygous α -thalassemia: clinical presentation, diagnosis, and management. A review of 46 cases. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:680-4.
2. Nakayama R, Yamada D, Steinmiller V, Hsia E, Hale RW. Hydrops Fetalis Secondary to Bart Hemoglobinopathy. *Obstet Gynecol* 1985;67:176-80.
3. Tan LS, Tseng AMP, Thong PW. Bart's Hydrops Fetalis: Clinical Presentation and Management: An Analysis of 25 Cases. *Aust NZ J Obstet Gynecol* 1989;29:233-7.
4. Winichagoon P, Higgs DR, Goodbourn SEY, Clegg JB, Weatherall DJ, Wasi P. The molecular defect of α -thalassemia in Thailand. *EMBO J* 1984;3:1813-18.
5. Tanphaichitr VS, Pung-amritt P, Puchaiwatananon O, Winichagoon P, Fucharoen S, Suvatte V, Wasi P. Studies of hemoglobin Bart's and deletion of α -globin genes from cord blood in Thailand. *Birth Defects* 1988;23:15-21.
6. Lemmens-Zygulska M, Eibel A, Helbig B, Sanguansermsri T, Horst J, Flatz G. Prevalence of α -thalassemias in northern Thailand. *Hum Genet* 1996;98:345-7.
7. Erlich HA. PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. M Stockton Press 1989;166.

8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Purification of nucleic acid. In : Molecular cloning: A laboratory manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989;E3-E7.
9. Torcharus K, Sriphaisal T, Krutvacho T, et al. Prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis by PCR technique: Pramongkutklao experience. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995;26 (suppl 1) :287-90.
10. Chehab FF, Doherty M, Cai S, Kan YW, Cooper S, Rubin E. Detection of sickle cell anemia and thalassemia. Nature 1987;329:293-4.
11. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongskdi S, Fukumaki Y. Detection of α -thalassemia-1 (Southeast Asian type) and its application for prenatal diagnosis. Clin Genet 1995; 47:318-20.
12. Ko TM, Hsieh FJ, Hsu PM, Lee TY. Prenatal diagnosis of Chinese homozygous α - and ψ globin gene in chorionic villi and amniocytes. Prenat Diagn 1989;9:715-25.
13. Dozy AM, Forman EN, Abuelo DN, et al. Prenatal diagnosis of homozygous α -thalassemia. JAMA 1979;241:1610-2.
14. Chang JG, Lee LS, Lin CP, Chen PC. Rapid diagnosis of α -thalassemia 1 of Southeast Asian type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. Blood 1991;78:853-854.
15. Bowden DK, Vickers MA Higgs DR. A PCR-base strategy to detect the common severe determinants of α -thalassemia. Br J Haematol 1992;81:104-108.



หมูโลหิตบอณิสัย

ลักษณะนิสัยของบุคคลในหมูโลหิตต่างๆ ได้จากผลสรุปของการรวบรวมข้อมูล ทางสถิติที่ว่า บุคคลที่มีพื้นฐานด้านจิตใจและอารมณ์เช่นใด ควรจะมีพฤติกรรมออกมาในรูปใดได้บ้าง ถึงแม้จะไม่สามารถอ้างอิงทางวิชาการได้ แต่ก็เป็นประโยชน์ต่อทุกท่านในการศึกษาอุปนิสัยของบุคคลในกรูปลือตต่างๆ เพื่อจะได้นำไปสู่สัมพันธภาพอันราบรื่นระหว่างท่านกับผู้ที่ท่านต้องการใกล้ชิด เพราะการคบหากับคนรู้ใจย่อมเกิดผลดีอย่างยิ่ง

เรียบเรียงจาก หนังสือกรูปลือตอ่านคน (...บอกรัก...) แปลโดย ยี่สิบเจ็ดกุมภ์



หมู เอ

เชื่อมั่นในตนเอง ไม่ชอบแสดงความคิดเห็นที่ขัดแย้งกับผู้อื่นรักสวยรักงาม รสนิยมในการแต่งกายดีเลิศ รักใคร่รักจริงทั้งสี่ห้องหัวใจ หากรักเปลี่ยนเป็นช้ำ จะสลัดทิ้งไปได้ด้วยความเข้มแข็งถึงแม้หน้าตาตกใจ ก็ไม่ต้องการให้ใครมาสงสาร

อาชีพที่เหมาะสม นายควรวรราชการ หญิงเป็นนักเศรษฐศาสตร์ชั้นเยี่ยม



หมู บี

นิสัยร่าเริงรักอิสระ สังคมเก่งทำงานเก่งมีประสิทธิภาพเป็นคนใจกว้าง แต่เด็ดเดี่ยว และกล้าแสดงความคิดเห็นจริงจังกับความรักมาก รักใคร่รักจริงแน่วแน่ไม่เสื่อมคลาย

อาชีพที่เหมาะสมกับท่านคือศิลปิน นักประพันธ์ หรือผู้สื่อข่าวหากทำงานในองค์กรใหญ่ มีโอกาสถึงระดับผู้บริหาร



หมู โอ

มีความสุขรอบคอบ ตัดสินใจด้วยเหตุผลผลการกระทำทุกอย่างตั้งอยู่บนความจริงถือคติ สิบปากว่า ไม่เท่าตาเห็นมีความโอบอ้อมอารี รักเพื่อนพ้องเป็นผู้บังคับบัญชาที่ดี เป็นที่โปรดปรานของเจ้านาย

อาชีพควรเป็นทนายความหรือผู้ตรวจสอบบัญชีหรืองานที่มีความมั่นคงมาก



หมู เอบี

มีอารมณ์อ่อนไหว คิดมาก ขณะเดียวกันมีความคิดกว้างไกลชนิดที่คนอื่น ๆ คิดไม่ทัน แต่เป็นคนมีใจเมตตาเห็นใจในความทุกข์ของผู้อื่น ชอบช่วยเหลือผู้อื่นรักใคร่รักสุดหัวใจเกลียดใครเกลียดเข้ากระดูกดำ

อาชีพที่เหมาะสมน่าจะเป็นนักประดิษฐ์คิดค้นเพราะมีความอัจฉริยะอยู่