

Determinants of micronutrient status, DDT residues and pregnancy outcomes: cross-sectional studies in pregnant and post partum women from Maela refugee camp, North-Western Thailand

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaften

vorgelegt von

Wolfgang Stütz

aus Weingarten

2009

Summary

Rationale: Micronutrient malnutrition remains prevalent in the displaced population on the north-western border of Thailand. Deficiency of thiamine and vitamin A as well as high prevalence of anaemia were documented in pregnant and postpartum women of Maela refugee camp (pop: 45 000). Food rations provided by charities are adequate in energy and protein but low in micronutrient content. During antenatal care pregnant and lactating women receive additional food and supplements of thiamine, folic acid and ferrous sulphate. In July 2004 whole wheat flour fortified with vitamins and minerals was introduced to the whole population in Maela.

DDT was sprayed as an insecticide to control malaria until 2000. Its residues may interact with micronutrients and may affect pregnancy outcomes.

Objectives: To examine effects of antenatal iron and micronutrient supplementation and of introduced micronutrient enriched flour (MEF) on biochemical status of iron and micronutrients during pregnancy and in post partum; to elucidate the implication by micronutrients and DDT on pregnancy outcomes.

Methods: Two cross-sectional and follow-up studies among pregnant ($n > 1000$, 1st to 3rd trimester) and breast-feeding ($n > 600$, at week 12 post partum) women between 2004 and 2007 for the determination of iron status (serum ferritin, soluble transferrin receptor), whole blood thiamine, serum micronutrients (retinol, α -tocopherol, β -carotene, zinc, copper) and DDT residues and of iron, thiamine, micronutrient and DDT levels in breast milk.

All the pregnant women were followed to assess pregnancy outcomes (gestational age, birth weight, infant length, head- and arm circumference) and their relationship with blood micronutrients and DDT residues during pregnancy.

Results: Iron status, serum retinol, zinc, and β -carotene decreased during pregnancy. Retinol and zinc were higher whereas iron status and β -carotene were significantly lower in post partum than in early pregnancy. Whole blood thiamine increased with the number of weeks the supplement was provided and was still high at 12 weeks post partum. Serum α -tocopherol, copper and DDT residues during pregnancy increased concurrently with cholesterol and triglycerides and were

significantly lower in post partum. Milk levels of iron, thiamine, micronutrients except zinc and DDT were positively correlated to their respective blood levels in post partum. Markers for iron status indicated a decrease of iron stores and a high prevalence of iron deficiency anemia (one of 3 women) in late pregnancy despite high doses of provided ferrous sulphate. In addition the prevalence of zinc deficiency was notably high in both pregnant and breast-feeding women. The introduction of micronutrient enriched flour (MEF) had a significant positive impact on zinc and iron status: post partum women (PP1) who were initially provided with the MEF had significantly higher serum zinc and an improved iron status by means of lower soluble transferrin receptor (sTfR) and higher breast-milk iron compared to those post partum women (PP) who never received the flour; two years later serum zinc in each trimester of pregnancy and serum zinc and iron status (sTfR) in post partum were significantly higher than before the introduction of MEF.

DDT residues were mainly predicted by the years the women had been resident in Thailand rather than Burma; the number of former breast-fed children reduced the amount of DDT in serum and breast milk. Four to six years after the last DDT residual house spraying the previously described interactions between DDT's residues and vitamin A in serum of pregnant women were no longer obvious.

Gestational age, mother's weight and parity were the predominant determinants of pregnancy outcomes. Low gestational age at delivery, low maternal weight, nulliparity, smoking and female gender increased the risk of low birth weight (<2500 grams). Overall mean infant's birth weight and length, gestational age at outcome, mother's weight and serum α -tocopherol and zinc increased whereas DDT residues significantly decreased during the two years study period. Multivariate regression analysis revealed that serum fat adjusted α -tocopherol was a significant positive predictor whereas high iron storage, highest hematocrit levels, fat adjusted DDT residues, as well as elevated α -1 glycoprotein (AGP >1g/L - indicating infections) during pregnancy were significant negative predictors of mean birth weight. Hematocrit >37.5%, iron storage, serum fat adjusted DDT, and AGP >1g/L were also significantly inversely related to infant's arm circumference. Whole blood thiamine per volume and per hemoglobin had a significant positive impact on infant's length. Serum β -carotene and α -tocopherol were positively whereas serum retinol, DDT and AGP >1g/L were negatively associated with newborn's head circumference.

Conclusion: Thiamine status following supplementation during pregnancy results in adequate blood concentrations in pregnant and post-partum women and reflects good compliance to supplementation. On the contrary the high prevalence of iron deficiency despite the provision of ferrous sulphate suggests inadequate dietary sources of iron and a low acceptance to iron supplements. An improvement of compliance compared to iron supplements is eligible. MEF showed a sustainable positive effect on zinc and iron status in both pregnant and lactating women. The provision of zinc supplements and the enrichment of already well accepted food such as fish paste would be further promising measures to reduce the prevalence of zinc and iron deficiency. Vitamin A deficiency is not a severe public health problem in Maela and serum retinol was no longer obviously confounded by DDT residues.

Blood levels of α -tocopherol, β -carotene and thiamine di-phosphate during pregnancy were positively whereas high iron status, highest hematocrit, elevated AGP and DDT residues were found to be negatively associated with newborn's weight and size parameters. Iron status and micronutrient levels in pregnancy may have direct effects or may be markers for other predictors of these pregnancy outcomes. High iron status, high serum retinol and highest hematocrit levels, particular in 3rd trimester, could reflect insufficient hemodilution and therefore reduced placental blood flow and fetal development. Higher α -tocopherol might be simply the consequence of an increased intake of vegetable oil or might reflect a well-balanced antioxidant status. The positive impact by thiamine on foetal growth regarding length is an important finding which identified thiamine supplements as an effective intervention to increase newborn length in a population having one third of pregnant women <150 cm of height. The impact by in utero exposure to DDT on birth weight even though being significant was small. DDT effects on pregnancy outcomes and micronutrient levels might be more obvious in endemic malaria areas where it is actually in regular use for indoor residual spraying but need to be carefully assessed in context to its efficiency in controlling malaria and to disease burden in high-transmission areas.

Zusammenfassung

Rationale: Die Versorgung mit Mikronährstoffen in den Flüchtlingslagern entlang der nordwestlichen Grenze Thailands ist unzureichend. Im Maela camp, der bis heute größten Siedlung mit Flüchtlingen (45000 Einwohner) aus dem benachbarten Burma stellen Thiamin- und Vitamin A Mangel sowie Anämie während als auch nach der Schwangerschaft ein ständiges Problem dar. Die von Wohlfahrtsstiftungen bereitgestellten Lebensmittelrationen liefern ausreichend Energie und Proteine doch zuwenig an lebensnotwendigen Mikronährstoffen. Schwangere und stillende Frauen erhalten bei der Betreuung in den Kliniken zusätzliche Lebensmittelrationen sowie Supplemente an Thiamin, Folsäure, und Eisensulfat. Im Juli 2004 wurde ein mit Vitaminen und Spurenelementen angereichertes Mehl als ergänzendes Nahrungsmittel für die in Maela lebende Bevölkerung eingeführt. DDT wurde hier bis zum Jahre 2000 als Insektizid zur Kontrolle von Malaria eingesetzt. Die daraus resultierenden Rückstände könnten mit Mikronährstoffen interagieren sowie einen schädlichen Einfluß auf den Schwangerschaftsverlauf ausüben.

Studienziele: Bewertung des Einflusses von Eisen- und Mikronährstoffsupplementen und Mikronährstoff angereichertem Mehl auf den Eisen- und Mikronährstoffstatus in der Schwangerschaft und in post partum; Bedeutung und Konsequenz der Mikronährstoffe und DDT Rückstände für die fötale Entwicklung und den Erfolg der Schwangerschaft.

Methoden: Zwischen 2004 und 2007 wurden zwei Querschnitts- und follow-up Studien mit schwangeren ($n > 1000$, 1-3. Trimenon) und stillenden Frauen ($n > 600$, in Woche 12 post partum) zur Bewertung des Eisenstatus (Serum ferritin, Transferrin Rezeptor) und zur Bestimmung von Thiamin im Vollblut, Mikronährstoffen (Retinol, α -Tocopherol, β -Carotin, Zink, Kupfer) und DDT Rückständen im Serum sowie von Eisen, Thiamin, Mikronährstoffen und DDT in der Frauenmilch durchgeführt.

Als funktionelle Indikatoren für den Ernährungsstatus und Verlauf der Schwangerschaften wurden Alter, Gewicht, Größe sowie Kopf- und Armumfang der Neugeborenen und deren Relation zu den gemessenen Mikronährstoffen und DDT Rückständen im Blut während der Schwangerschaft bewertet.

Ergebnisse: Der Eisenstatus sowie Retinol, Zink und β -Carotene im Serum nahmen mit zunehmender Schwangerschaftswoche ab. In der 12. Woche post partum waren Retinol und Zink höher, jedoch β -Carotene und der Eisenstatus signifikant niedriger als im ersten Trimester der Schwangerschaft. Thiamin im Vollblut nahm mit Anzahl der Wochen an ausgegebenen Supplementen zu und war nachhaltig hoch in post partum. In der Schwangerschaft nahmen α -Tocopherol, Kupfer und DDT Rückstände im Serum gleichzeitig mit Cholesterol und Triglyzeriden kontinuierlich zu und waren signifikant niedriger in post partum. Die Konzentrationen an Eisen, Thiamin, DDT und der Mikronährstoffe in der Milch mit Ausnahme von Zink korrelierten positiv mit den entsprechenden Blutwerten in post partum. Trotz höchster Dosen ausgegebenem Eisensulfats zeigten Indikatoren für den Eisenstatus eine hohe Prävalenz an leeren Speichern sowie Eisenmangelanämie (eine von drei Frauen) im dritten Trimenon. Zudem war der Anteil an schwangeren und stillenden Frauen mit Zinkmangel bemerkenswert hoch. Mit Einführung des ‚Mikronährstoff angereicherten Mehles‘ (MAM) zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Zink- und Eisenstatus: Frauen in post partum welche während der Stillphase mit MAM versorgt wurden hatten signifikant höheres Serum Zink und einen verbesserten Eisenstatus (niedrigere Transferrin Rezeptor Werte im Serum und höhere Eisenkonzentrationen in der Milch) als vergleichbare Frauen in post partum welche das Mehl noch nicht erhielten. Zwei Jahre später waren Serum Zink in der Schwangerschaft sowie Serum Zink und Eisenstatus in post partum signifikant höher als vor der Einführung des MAM.

Die Menge an DDT Rückstände erklärten sich in der Hauptsache über die Aufenthaltszeit in Thailand und Anzahl bereits zuvor gestillter Kinder: DDT und Metaboliten im Serum und der Frauenmilch nahmen mit der Anzahl der Jahre im Maela camp oder in Thailand lebend signifikant zu; dagegen nahmen die Rückstandsmengen mit der Anzahl der Stillmonate bzw. bereits gestillter Kinder signifikant ab. Vier bis sechs Jahre nach dem letzten DDT Einsatz in den Häusern im Maela camp war die zuvor in Vorstudien beschriebene Wechselwirkung zwischen DDT Rückständen und Serum Vitamin A in der Schwangerschaft nicht mehr offensichtlich.

Die ausschlaggebenden Faktoren für eine erfolgreiche Schwangerschaft waren vor allem Schwangerschaftsdauer sowie das Gewicht und die Parität der Mutter. Frühgeburten, niedriges Gewicht der Mutter, Rauchen, das erstgeborene Kind und weibliches Geschlecht des Neugeborenen waren mit einem Risiko für ein zu

niedriges Geburtsgewicht (<2500 Gramm) oder intrauterine Wachstumsstörungen assoziiert. Insgesamt nahmen über die Studienzeit von mehr als 2 Jahren das Gewicht und die Größe der Neugeborenen, das Schwangerschaftsalter am Tag der Entbindung, und das Gewicht sowie α -Tocopherol und Zink im Serum der Mütter signifikant zu; DDT Rückstände nahmen im gleichen Zeitraum signifikant ab.

Multivariate Regressionsanalysen zeigten Serumfett-korrigiertes α -Tocopherol in der Schwangerschaft als einen signifikant positiven Prädiktor für das Geburtsgewicht. Dagegen zeigten hohe Eisenspeicher, höchste Hämatokritwerte, fettkorrigierte DDT-konzentrationen und ein erhöhtes α -1 Glykoprotein (AGP, Marker für Infektionen) einen signifikant negativen Einfluss auf das Gewicht und den Armumfang der Neugeborenen. Thiamin im Vollblut und korrigiert nach Hämoglobinwerten hatte einen signifikant positiven Einfluss auf die Geburtsgröße der Kinder. Serum β -Carotene und α -Tocopherol in der Schwangerschaft zeigten einen signifikant positiven Einfluss auf den Kopfumfang; Serum Retinol, DDT und erhöhtes AGP waren negativ mit dem Kopfumfang der Neugeborenen assoziiert.

Schlussfolgerung: Der Thiaminstatus gemessen an Thiaminkonzentrationen im Blut war mehr als zufriedenstellend und spiegelte eine gute compliance gegenüber den Supplementen wieder. Dagegen lässt die sehr hohe Prävalenz an Eisenmangel trotz bereitgestellter Eisensulfat-Tabletten eine niedrige Akzeptanz gegenüber den Eisensupplementen bei zugleich unzureichender Nahrungsquellen für Eisen vermuten. Eine verbesserte compliance zu den Eisensupplementen wäre sehr wünschenswert. MAM zeigte einen nachhaltig positiven Effekt auf den Zink- und Eisenstatus bei schwangeren wie auch bei stillenden Frauen. Zusätzliche Zinksupplemente und die Anreicherung von Spurenelementen in bereits sehr gut akzeptierten Nahrungsmitteln wie der Fischpaste wären weitere erfolgversprechende Maßnahmen um die hohe Rate an Eisen- und Zinkmangel zu reduzieren. Vitamin A Mangel scheint kein ernstes Gesundheitsproblem und Serum Retinol war nicht mehr offensichtlich durch DDT Rückstände beeinflusst.

α -Tocopherol, β -Carotene and Thiamin waren positive wohingegen ein hoher Eisenstatus, höchste Hämatokritwerte, erhöhtes AGP und DDT Rückstände in der Schwangerschaft waren negative Prädikatoren für Gewicht und Größenparameter der Neugeborenen. Eisenstatus und Mikronährstoffe könnten einen direkten Einfluss auf das fötale Wachstum ausüben oder sind Parameter für andere Faktoren die für

eine gesunde und erfolgreiche Schwangerschaft verantwortlich sein könnten. Hoher Eisenstatus, hohes Serum Retinol und höchste Hematokritwerte, vor allem im 3. Trimester, scheinen eine unzureichende Blutverdünnung mit daraus folgendem reduziertem Blutfluss über die Plazenta und somit Hemmung der fötalen Entwicklung wiederzuspiegeln. Höheres α -Tocopherol könnte ganz einfach die Konsequenz des vermehrten Konsums von Pflanzenöl sein oder aber einen positiv ausgeglichenen Antioxidantienstatus reflektieren.

Der Einfluss von Thiamin auf das in utero Längenwachstum ist eine bemerkenswerte Beobachtung, welche die Supplementierung mit Thiamin als eine höchst effiziente Maßnahme zur Verbesserung der Neugeborenenengröße in einer Gesellschaft, in der jede dritte Schwangere < 150 cm groß ist, demonstriert. Der negative Einfluss von DDT in utero auf das Geburtsgewicht war trotz statistischer Signifikanz verhältnismäßig gering. Deutlichere Effekte auf Schwangerschaftsverlauf, foetales Wachstum und Mikronährstoffe könnten sich in anderen endemischen Malaria-gebieten zeigen, in denen DDT noch aktuell eingesetzt wird. Allerdings sollten hier für eine umfassende Bewertung der Vorteil des DDTs als das bis heute effektivste Insektizid zur Kontrolle der Malaria sowie die Folgen und Risiken in der Schwangerschaft an Malaria zu erkranken als Argumente für den DDT Einsatz berücksichtigt werden.