การแปลผลการตรวจชนิดของ ฮีโมโกลบิน

สมชาย อินทรศิริพงษ์, พ.บ. (เกียรตินิยม)*

ธาลัสซีเมีย และ ฮีโมโกลบินผิดปกติ เป็นโรคทางกรรมพันธุ์ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย[1] มีอาการได้หลายระบบมีทั้งที่มีอาการมากจนถึงแก่ชีวิตตั้งแต่แรกเกิด และไม่มีอาการเลย อาการหลักได้แก่ ภาวะโลหิตจาง ชนิด microcytic หรือ ค่า MCV น้อยกว่า 80 femtolit (fL), hypochromic หรือค่า MCH ต่ำกว่า 27 picogram (pg) ซึ่งมีความรุนแรงแตกต่างกันมากมายแล้วแต่ชนิด ความแตกต่างนี้ แตกต่างแม้แต่ผู้ที่มี genotype เหมือนกัน กลุ่มที่มีอาการรุนแรงนอกจากอาการโลหิตจางแล้ว อาการอื่น ๆ ได้แก่ ตายตั้งแต่แรกคลอด ที่รุนแรงน้อยกว่านั้นได้แก่เติบโตช้ากว่าเด็กในวัยเดียวกัน ก้าวเข้าสู่วัยรุ่นที่ช้ากว่า ตับม้ามโต ตาเหลือง โครงสร้างของใบหน้าและศีรษะ มีการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะจำเพาะแบบที่เรียกว่า thalassemic facy ได้แก่ศีรษะโต หน้าแบน ฟันหน้าบนยื่น โหนกแก้มสูง หน้าผากโหนกต้องเข้ารับการเติมเลือดเกือบทุกเดือน และในท้ายที่สุดอายุสั้นกว่าคนทั่วไปเพราะมีเหล็กสะสมมากเกินไป โดยเฉพาะที่หัวใจจนเกิดภาวะหัวใจวายเสียชีวิต

เมื่อแพทย์พบผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะมีภาวะโลหิตจาง ธาลัสซีเมีย หรือ ฮีโมโกลบินผิดปกติ โดยการซักประวัติ หรือ การตรวจร่างกาย หรือ ในรายที่สงสัยว่าจะเป็นพาหะ เช่น มีลูกที่เป็นธาลัสซีเมีย หรือ ฮีโมโกลบินผิดปกติ หรือมีพี่น้องเป็นโรคกลุ่มนี้อยู่แล้ว ต้องมีการส่งตรวจ CBC และ hemoglobin eletrophoresis เพื่อช่วยในการวินิจฉัย ส่วนในรายที่ฝากครรภ์ จะมีการตรวจคัดกรองขั้นต้นก่อน ด้วยการตรวจ CBC, single tube osmotic fragility test (OF) และ DCIP (Dichloro indophenol) precipitation test[2] และ อาจมีการใช้ค่า MCV จาก CBC มาร่วมคัดกรองด้วย

เมื่อส่งตรวจ Hb electrophoresis แล้ว นักเทคนิคการแพทย์ ก็จะช่วยแปลผลการตรวจให้ ทำให้แพทย์สะดวกสบายมากยิ่งขึ้น แต่ในขณะเดียวกันก็อาจจะขาดความครอบคลุมได้ เนื่องจากนักเทคนิคการแพทย์ไม่มี โอกาสพบผู้ป่วย ไม่ทราบประวัติผู้ป่วย โดยเฉพาะประวัติการเติมเลือดมาก่อน ทำให้การแปลผล ซึ่งบางส่วนจะต้องอิงไปกับอายุผู้ป่วย ประวัติการเติมเลือด อาการและอาการแสดงของผู้ป่วย มีความแม่นยำไม่เต็มที่ เช่น ถ้าผู้ป่วยได้รับเลือดมาก่อนภายใน 3 เดือน การส่งตรวจ Hb electrophoresis อาจจะเป็นผลของเลือด ผู้ป่วยและเลือดที่ได้รับมาผสมกันก็ได้

ฮีโมโกลบิน เป็นโปรตีนหลักที่พบในเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วยส่วนของฮีม (heme) ซึ่งเกิดจากโมเลกุลของเหล็กรวมตัวกับสารประกอบ porphyrin เรียงเป็น

* หน่วยโลหิตวิทยา กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จ.นครราชสีมา 30000

วงรอบโมเลกุลของเหล็กชนิด ferrous และกลุ่มสายของกรดอะมิโน 2 คู่สาย หรือ 4 สาย ซึ่งโดยปกติจะเป็นสายคู่เหมือนของ α (alpha) globin chain 1 คู่ และของสาย non-alpha globin chain 1 คู่ โดยสมาชิกของสายกลุ่ม non-alpha globin chain ได้แก่สาย β (beta), γ (gamma) และ δ (delta)

สาย alpha globin chain จะประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงตัวกัน 141 ตัว ควบคุมการสร้างด้วย alpha globin genes ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง (loci) ตั้งอยู่บน chromosome หมายเลข 16

ส่วนสาย beta globin chain มีกรดอะมิโน 146 ตัว ควบคุมการสร้างด้วย beta globin genes ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง ตั้งอยู่บน chromosome หมายเลข 11 ส่วนตำแหน่งของยีนส์ที่ควบคุมการสร้างสาย แกมม่า และ เดลต้าก็อยู่ใกล้ชิดกับตำแหน่งของยีนส์ ของสายเบต้า รวมกันเป็น non-alpha globin genes complex

หลักการรวมกลุ่มของสาย globin chain (formation of globin chains) ให้เป็น hemoglobin ชนิดต่าง ๆ

ก. α globin 2 สาย + non α globin 2 สาย (dimer) เช่น $\alpha_2\beta_2$ เรียกว่า Hb A (adult), $\alpha_2\gamma_2$ เรียกว่า Hb F (fetal), $\alpha_2\delta_2$ เรียกว่า Hb A_2

ข. non α globin 2 สาย+non α globin 2 สาย ที่เหมือนกัน เรียกว่ารวมกันเองเป็น tetramer ซึ่งเป็นความสามารถเฉพาะของกลุ่ม non α globin เท่านั้น ได้แก่ β_4 เรียกว่า Hb H, γ_4 เรียกว่า Hb Bart โดยที่สายกลุ่ม α globin ไม่สามารถทำแบบนี้ได้

ธาลัสซีเมีย เป็นกลุ่มโรคทางโลหิต ที่เกิดจากความผิดปกติของยีนส์ ทำให้สร้างสาย globin chain ได้น้อยลง (quantitative defect) ส่วนฮีโมโกลบินผิดปกติ (hemoglobinopathy) เป็นโรคที่เกิดจากการสร้างสาย globin chain ที่ผิดปกติ (quantitative defect) เช่น กรดอะมิโนผิด แม้เพียงตำแหน่งเดียวก็อาจจะก่อความผิดปกติให้แก่ผู้ป่วยได้อย่างมากมาย ไม่ว่าปริมาณ ของสายโกลบินนั้นๆ จะลดลงด้วยหรือไม่ก็ได้

ธาลัสซีเมียแบ่งได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ตามการขาดหรือลดลงของสาย globin นั้น ได้แก่ α thalassemia ผู้ป่วยจะสร้างสาย alpha globin ได้น้อยลง ดังนั้นสาย non-alpha ได้แก่ β, γ หรือ δ globin ที่ไม่มีคู่สาย α มาจับคู่ จึงรวมตัวกันเองเป็น tetramer ที่พบบ่อยได้แก่ β_4 เรียกว่า Hb H สาย γ รวมตัวกันเองเป็น γ_4 เรียกว่า Hb Bart ส่วนสาย δ ซึ่งมีน้อยมาก จึงไม่พบว่ามีการรวมตัวกันเอง

อีกชนิดได้แก่ β thalassemia ผู้ป่วยสร้างสาย β ได้น้อยลง ยีนส์คอมเพล็กซ์ของกลุ่ม non-alpha จึงสร้างสาย γ และ δ ขึ้นมาชดเชยสาย β globin ที่ลดลงไป ทำให้มี Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) และ Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) เพิ่มขึ้น ส่วนสาย α ที่มากเกินไป โดยธรรมชาติจะไม่สามารถจับกันเองได้ แต่จะตกตะกอนอยู่ในเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน ทำให้เม็ดเลือดแดงตายตั้งแต่อยู่ในไขกระดูกไม่สามารถเจริญเป็นเม็ดเลือดแดงแก่ออกมานอกไขกระดูกได้ เรียกว่า ineffective erythropoiesis ทำให้ผู้ป่วย homozygous beta thalassemia หรือ beta thalassemia / hemoglobin E นอกจากจะมีภาวะโลหิตจางจากการมี ภาวะ chronic hemolysis แล้ว ยังมีส่วนที่โลหิตจางจาก ineffective erythropoiesis สมทบร่วมด้วย

การตั้งชื่อ ฮีโมโกลบิน ชนิดต่าง ๆ

1. ตั้งตามธรรมชาติ ได้แก่ Hb A หรือ adult hemoglobin เพราะพบในผู้ใหญ่, ต่อมาเมื่อมีการตรวจละเอียดขึ้น จึงพบ Hb A_2 ใน adult เช่นกัน, ส่วน Hb F หรือ fetal hemoglobin เพราะว่าพบมากในทารกแรกเกิด หรือ fetus

2. ตั้งชื่อตามลำดับอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ในภาษาอังกฤษ จาก A ไล่ไปเรื่อยจนถึง Q ยกเว้นตัวอักษร B (เพราะ B สงวนไว้เรียกชื่อเล่นของ beta globin genes ว่า HBB) เช่น Hb C, Hb D, Hb E ฯลฯ จนเมื่อถึงอักษร Q กลุ่มผู้เชี่ยวชาญทั้งหลายได้ตกลงร่วมกันว่าจะหยุดเพียงแค่นี้ เพราะยังจะมี Hb อีกมากมายหลายร้อยชนิดที่รอการค้นพบในอนาคต เกรงว่าตัวอักษรจะมีไม่พอให้ใช้

3. ตั้งชื่อตามสถานที่ที่ค้นพบ หรือที่ที่ทำวิจัย หรือ ชื่อเมืองที่พบผู้ป่วยคนแรก เช่น Hb Bart หรือ ชื่อเต็มคือ Hb Bartholomew ตั้งตามชื่อโรงพยาบาลที่ค้นพบคือ Saint Bartholomew Hospital ในสหราชอาณาจักร, Hb Constant-Spring ตั้งตามชื่อเมืองที่พบผู้ป่วยของ ประเทศจาไมก้า ในอเมริกากลาง, ส่วนที่พบในประเทศไทยมีมากมาย เช่น Hb มหิดล, Hb สยาม, Hb ปากเซ, Hb ตาก, Hb สวนดอก, Hb อานันทราช, Hb ศิริราช, Hb ปากน้ำโพ และเมืองใกล้เคียงกับประเทศของเรา เช่น Hb กวางสี, Hb ปากเซ ฯลฯ ด้วยวิธีตั้งชื่อแบบนี้ ห้ามตั้งหมายเลขต่อหลัง เช่น Hb สวนดอก$_2$ เพราะ เกรงว่าจะทำให้สับสนกับ Hb A_2

4. ตั้งชื่อผสมระหว่างตัวอักษรพิมพ์ใหญ่กับสถานที่ที่พบผู้ป่วยครั้งแรก หรือ ที่ทำการวิจัย เพราะเมื่อตรวจ Hb electrophoresis แล้วพบว่ามี Hb band ใหม่วิ่งทับ band ของ Hb เดิมที่มีชื่อนั้น ๆ อยู่แล้ว แต่เมื่อตรวจวิเคราะห์รายละเอียดแล้ว พบว่าแตกต่างไปจากของเดิม จึงตั้งชื่อตามตัวอักษรของ Hb ที่มันวิ่งทับ ตามด้วยชื่อสถานที่ เช่น Hb J โคราช, Hb J บางกอก, Hb J Baltimore, Hb J Toronto, Hb J Broussais, Hb J Meerut, Hb J Mexico, Hb J Iran, Hb J Tongariki เป็นต้น

5. ตั้งชื่อตามคุณสมบัติเฉพาะของฮีโมโกลบินชนิดนั้น ๆ เช่น Hb S หรือ sickle (เคียว) เพราะเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่มี Hb S มีรูปร่างคล้ายเคียว ไม่ได้เป็นรูปโดนัทแบบเม็ดเลือดแดงทั่วไป, Hb M เพราะโมเลกุลของเหล็กในฮีโมโกลบินชนิดนี้อยู่ในรูป ferric compound (Fe^{3+}) ไม่ใช่ ferrous compound (Fe^{2+}) แบบฮีโมโกลบินชนิดอื่น ๆ ทั่วไป เมื่อรวมกับสายโกลบินทั้งหลาย ก็กลายเป็น methemoglobin ไม่ใช่ oxyhemoglobin ทำให้จับกับโมเลกุลออกซิเจนไม่ได้ ผู้ป่วยจึงมีอาการ central cyanosis ตั้งแต่แรกเกิด เช่น Hb M Hyde Park, Hb M Saskatoon หรือ Hb M Iwate[3]

ปัจจุบันมี Hb ชนิดต่าง ๆ ที่พบแล้ว และได้ลงทะเบียนเป็นหลักฐานไว้ประมาณ 800 ชนิด[4] และหลายชนิดก็พบได้ในประเทศไทย บางชนิดก็พบได้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยโดยคณะแพทย์ชาวไทยเอง จึงมีชื่อเป็นภาษาไทยมากมาย เช่น Hb อนันทราช, Hb ตาก, Hb มหิดล, Hb เจ โคราช, Hb นครราชสีมา[5] เป็นต้น นับได้ว่าประเทศไทยเป็นดินแดนที่อุดมไปด้วย Hb ชนิดต่าง ๆ จำนวนมาก ประกอบกับมีผู้เชี่ยวชาญมากมายช่วยกันตรวจ เลยมี Hb ทั้งที่ค้นพบแล้ว และเชื่อว่ายังมีเหลือรอการค้นพบในอนาคต อีกมากมาย

การตรวจชนิดของ Hb อาศัยหลักการเคลื่อนที่ของ Hb ชนิดต่าง ๆ บนสนามไฟฟ้า หรือเคลื่อนตามประจุที่ต่างกัน จึงเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากัน ทำได้หลายวิธี เช่น cellulose acetate electrophoresis (CAE), high performance liquid chromatography (HPLC), capillary zone electrophoresis (CZE) แต่ละวิธี Hb band จะวิ่งด้วยความเร็วที่ต่างกัน ทำให้ทราบได้ว่า ผู้ป่วยมี band ของ Hb อะไรบ้าง อย่างละร้อยละเท่าใด จากชนิดต่าง ๆ ของ Hb และร้อยละของมันจึงจะนำมา เพื่อประกอบการวินิจฉัย thalassemia และ Hemoglobin ผิดปกติ ชนิดต่าง ๆ

ในฮีโมโกลบินชนิดต่าง ๆ ต้อง มีสาย alpha globin 2 สาย และ non-alpha อีก 2 สาย หรือ non-alpha ทั้ง 4 สายเหมือนกัน การจำส่วนประกอบนี้ได้ จะช่วยให้เข้าใจการแปลผลของ Hb electrophoresis ได้ดียิ่งขึ้น Hb ทั้งปกติ และ ผิดปกติ ที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ Hb A($\alpha_2\beta_2$), Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$), Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), Hb Bart (γ_4), Hb H (β_4), Hb E ($\alpha_2\beta_2^{26glutlys}$), Hb Constant-Spring ($\alpha_2\beta_2$ with elongation of globin)

ในผู้ใหญ่ปกติ ผลการตรวจ Hb electrophoresis จะได้เป็น Hb A_2 และ Hb A ส่วนใหญ่เป็น Hb A ส่วนปริมาณของ Hb A_2 พบประมาณ ร้อยละ 2.5 บางรายอาจจะมี Hb F ได้บ้าง แต่ค่าน้อยกว่าร้อยละ 1 เสมอ

ส่วนในทารกแรกเกิด จะมี Hb F เป็นจำนวนมาก เพราะตอนอยู่ในครรภ์มารดา ทารกต้องได้รับออกซิเจนมาจากเลือดมารดาเพียงแหล่งเดียวเท่านั้น จึงต้องอาศัย Hb F ซึ่งมี O_2 affinity มากกว่า Hb A จึงแย่งชิงออกซิเจน

จากเลือดของมารดาได้ดีแต่การปลดปล่อยออกซิเจนให้แก่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ก็พลอยน้อยไปด้วย ดังนั้นออกซิเจนจึงไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกายของทารก ทารกเลยต้องสร้าง Hb เป็นจำนวนมากขึ้นมาชดเชยค่า normal Hb concentration ของทารกจึงต้องมากกว่าของผู้ใหญ่เป็นธรรมดา พอหลังคลอดร่างกายทารกสัมผัสกับอากาศ ที่มีออกซิเจนจำนวนมากโดยตรง จึงหยุดการสร้าง Hb F ทันทีและเริ่มต้นสร้าง Hb A แต่การสร้างเม็ดเลือดแดงช้ากว่าการทำลายผลจึงทำให้ทารกแรกเกิดจึงมักมี physiologic anemia ได้ในช่วง 1-3 เดือนแรกของชีวิต จนกว่าจะมีการทำลายเม็ดเลือดแดงเก่าที่มี Hb F หมด อย่างน้อยก็ตามอายุขัยของเม็ดเลือดแดงได้แก่ 120 วัน ผลการตรวจ Hb electropho-resis จึงจะกลับมาเป็นเหมือนของผู้ใหญ่ และเนื่องจากหลังคลอดใหม่ ๆ ก็อาจจะยังมีการสร้างเม็ดเลือดแดงที่มี Hb F อยู่บ้าง ดังนั้นเพื่อความแม่นยำและความมั่นใจในการแปลผล ควรรอให้ทารกอายุได้ 1 ปีขึ้นไปจึงค่อยทำการตรวจ Hb electrophoresis

การที่ α globin genes มี 4 loci บน 1 chromosome ซึ่งมี 2 chromatid (αα/αα) ถ้าพิจารณาเพียง 1 chromatid ถ้าเนื้อยีนส์แหว่งหายไป (deletion) ทั้ง 2 loci เรียกว่า alpha thalassemia-1 genes หรือบางทีเรียกว่า alpha(0)-thalassemia genes (--) ถ้าเนื้อยีนส์แหว่งหายไปเพียง 1 ใน 2 loci ก็เรียกว่า alpha-thalassemia-2 genes หรือ บางทีเรียกว่า alpha (+)-thalassemia (-α) การที่เรียก 1 หรือ 2 นี้เรียกตามลำดับการค้นพบ เพราะในการพบครั้งแรก ย่อมพบชนิดที่รุนแรงกว่าเสมอ ต่อเมื่อมีวิธีการตรวจที่ดีกว่า ละเอียดกว่า จึงได้พบชนิดที่รุนแรงน้อยกว่า เรียกยีนส์ชนิดที่รุนแรงกว่า ว่าเป็น alpha thalassemia-1 genes เช่น Southeast Asian deletion genes ซึ่งพบประมาณร้อยละ 90 กว่าของคนไทยที่มี alpha-thalas-semia-1 genes ส่วนน้อยเป็น Thai deletion genes แล้วเรียกอย่างหลังว่าเป็น alpha thalassemia-2 genes ที่พบบ่อยในคนไทยได้แก่ -3.7 kb และ -4.2 kb deletion genes

ภาวะ homozygous alpha-thalassemia-1 หรือ alpha-thalassemia-1 disease (--/--) จะไม่มีสาย alpha globin เลยก่อให้เกิดอาการโลหิตจางอย่างรุนแรง ส่วนใหญ่จะตายคลอด (stillbirth) จากการที่ซีดมาก ทำให้หัวใจล้มเหลว เกิดของเหลวคั่ง และสะสมตามช่องต่าง ๆ ทั่วร่างกาย ไม่ว่าจะเป็น pleural, pericardial, peritoneal cavities และสะสมที่ soft tissues ต่าง ๆ ด้วย จึงพบตับโตจนไม่สามารถสร้าง albumin ได้ จึงซ้ำเติมภาวะบวมทั่วตัว และรกก็บวมหนักกว่าปกติ ในมารดาที่ตั้งครรภ์ทารกชนิดนี้ก็อาจจะพบภาวะแฝดน้ำ (polyhydramnios) หรือ มีภาวะพิษแห่งครรภ์มากกว่าคนที่ตั้งครรภ์ทารกปกติ ภาวะบวมทั่วตัว (anasarca) ของทารก โลหิตจาง และตายคลอดเช่นนี้เรียกว่า hydrops fetalis ถ้าตรวจ Hb typing จะพบ Hb Bart เป็นหลัก บางครั้งจึงเรียกทารกพวกนี้ว่า Hb Bart hydrops fetalis หรือ erythroblastosis fetalis ในการวิเคราะห์ทารกที่เป็น hydrops fetalis ในประเทศจีนตอนใต้ ไต้หวัน และในประเทศไทย พบว่าสาเหตุที่พบบ่อยที่สุด คือ homozygous alpha-thalassemia-1 หรือ Hb Bart hydrops fetalis นี่เอง[6-8] ส่วนใหญ่ภาวะนี้มักจะวินิจฉัยได้ด้วยความบังเอิญจากการตรวจครรภ์ด้วย ultrasound เพื่อดูภาวะต่าง ๆ ของการตั้งครรภ์ แล้วพบว่า ขนาดมดลูกใหญ่กว่าอายุครรภ์ ทารกบวมน้ำ ท้องโตมาก จนกอดอกไม่ได้ ถ้าเอ็กซเรย์ธรรมดาก็จะเห็นทารกอยู่ในท่าที่เรียกว่า Buddha position หรือ พระพุทธรูปปางห้ามญาติ หนังศีรษะทารกจะบวมน้ำจนหนา ถ้าหนามากกว่า 5 มม. ก็ถือว่ามีความสำคัญ ถ้าตรวจ ultrasound จะพบช่องว่างรอบ ๆ กะโหลกศีรษะ เรียกว่า Buddha sign

ภาวะ double heterozygous ระหว่าง alpha-thalassemia-1 และ alpha-thalassemia-2 (--/-α) ผู้ป่วยกลุ่มนี้สามารถสร้างสาย α globin ได้บ้างเพียงหนึ่งในสี่ ของที่ควรจะมี สาย beta globin จึงจับกันเองเป็น Hb H และ gamma globin จับกันเองเป็น Hb Bart ซึ่งค่อนข้างไม่เสถียร ทำให้เม็ดเลือดแตกง่าย เกิดภาวะ

chronic hemolytic anemia ขนาดปานกลางตั้งแต่แรกเกิด บางรายอาจจะต้องการเลือดเป็นครั้งคราวในช่วงที่มี hemolytic crisis จากการมีภาวะ oxidation เนื่องจากมีไข้สูง หรือต้องการเติมเลือดถี่ขึ้น เมื่ออายุมากขึ้น เมื่อตรวจ Hb electrophoresis จะพบ Hb A, A_2 และ Hb H ± Hb Bart จึงเรียกโรคนี้ว่า Hb H disease

ส่วนภาวะ double heterozygous ระหว่าง alpha-thalassemia-1 และ Hb Constant-Spring (CS) (--/-CS) หรือ Hb Pakse (--/-PS) ก็ตาม ทั้งยีนส์ของ Hb CS และของ Hb PS จะทำตัวเหมือนเป็นยีนส์ของ alpha-thalassemia-2 ทำให้เกิดภาวะ chronic hemolytic anemia เช่นเดียวกัน เรียกโรคกลุ่มนี้ว่า non-deletional Hb H disease ซึ่งอาการมักรุนแรงกว่าโรค Hb H ธรรมดาที่เกิดจากการขาดหายไปของเนื้อยีนส์ (deletional Hb H disease) เช่น ซีดมากกว่า อาการพบได้ในอายุที่น้อยกว่า reticulocyte count มากกว่า ค่า MCV จึงสูงกว่าโรค non-deletional Hb H disease ก็มี hemolytic crisis จากการมีภาวะ oxidation เนื่องจากมีไข้สูงได้เหมือนกัน เมื่อตรวจเลือดจะพบ Hb A, A_2 CS และ Hb H ± Hb Bart จึงเรียกโรคนี้ว่า Hb H-CS disease ส่วนจะเป็น Hb PS หรือไม่ ต้องตรวจละเอียดเพิ่มเติม แต่ไม่มีความแตกต่าง ในทางคลินิก ค่า Hb concentration เฉลี่ย เทียบระหว่าง โรค Hb H ธรรมดา, Hb H-CS และ Hb H-PS คือ 8.5±1.2, 7.1±2.3 และ 8.3±1.1 g% ตามลำดับ[9]

ส่วนผู้ที่มีภาวะ heterozygous ของ alpha-thalasse-mia-1 (--/$\alpha\alpha$) หรือ alpha-thalassemia-1 trait หรือ alpha-thalassemia-1 carrier และ homozygous ของ alpha-thalassemia-2 (-α/-α) หรือ alpha-thalassemia-2 disease อาจจะมีเพียงขนาด MCV ต่ำกว่า 80 fL ในผู้ป่วยส่วนใหญ่เท่านั้น ไม่มีภาวะโลหิตจาง เรียกว่า thalassemia minor มักให้ผลบวกต่อการตรวจความเปราะของเม็ดเลือดแดง (OF test) ในการคัดกรองมารดาที่มาฝากครรภ์ เมื่อตรวจ Hb typing ก็พบเพียง Hb A และ A_2 เหมือนคนปกติ ในบางรายอาจจะพบร้อยละของ Hb A_2 น้อยกว่า 2.5 % ซึ่งถ้าผู้ป่วยมี Hb concentration ปกติ แต่ MCV ต่ำกว่า 80 fL หรือ MCH ต่ำกว่า 27 pg หรือ OF test ให้ผลบวก ก็ควรตรวจ Hb typing ถ้าค่า Hb A_2 มากกว่า ร้อยละ 3.5-4 ก็แปลว่าเป็น beta thalassemia trait แต่ถ้าร้อยละของ Hb A_2 ปกติก็ต้องตรวจ PCR for alpha thalassemia-1 ต่อไป

ส่วนผู้ที่มีภาวะ heterozygous ของ alpha-thalassemia-2 หรือ alpha-thalassemia-2 trait หรือ alpha-thalassemia-2 carrier ผู้ป่วยก็ไม่มีโลหิตจาง ขนาดของเม็ดเลือดแดง หรือ MCV อาจจะปกติ หรือต่ำกว่าปกติก็ได้ รวมทั้ง MCH อาจจะปกติ หรือต่ำเล็กน้อยก็ได้ เรียกว่า thalassemia minima[10]

ยีนส์ที่ควบคุมการสร้างสาย beta globin มีเพียงคู่เดียว ผู้ป่วยที่เป็น double heterozygous ระหว่าง β thalassemia trait กับ Hb E trait เรียกโรคนี้ว่า beta thalassemia/hemoglobin E ซึ่งเป็นธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยผู้ใหญ่ของไทย ผู้ป่วยมักมีอาการโลหิตจาง ตับม้ามโต ซึ่งอาการสามารถแตกต่างกันได้แล้วแต่บุคคล ขึ้นกับหลายปัจจัย รวมทั้งตัวยีนส์ของ β thalassemia เองด้วย ว่าเป็น β^0 หรือเป็น β^+ ถ้าเป็นกรณีแรก การตรวจ Hb electrophoresis จะพบเพียง Hb E ครึ่งหนึ่ง กับ Hb F อีกครึ่งหนึ่งเท่านั้น เพราะไม่สามารถสร้างสาย β globin chain ปกติได้ จึงตรวจไม่พบ Hb A เลย ยีนส์ใกล้เคียงซึ่งอยู่ใน non-alpha globin genes complex เดียวกัน จึงสร้างสาย γ และ δ globin ขึ้นมาชดเชย จึงพบ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) และ Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) เพิ่มขึ้น ส่วนผู้ที่มียีนส์ β^+ thalassemia จะยังคงสร้างสาย beta globin ได้บ้างบางส่วน จึงตรวจพบ Hb A ได้จำนวนหนึ่ง

ส่วนผู้ที่เป็น homozygous beta thalassemia หรือ beta thalassemia disease นับเป็น thalassemia major ชนิดหนึ่งในประเทศไทย ผู้ป่วยจะมีอาการซีดชัดเจน ตั้งแต่หลังขวบแรกของชีวิตเป็นต้นมา ตัวเหลือง ตับ ม้ามโต เจริญเติบโตช้า อาจจะต้องเติมเลือดทุกเดือนเพื่อให้เจริญเติบโตได้บ้าง พอโตมาเป็นผู้ใหญ่ เมื่อส่งตรวจ Hb electrophoresis ถ้าเป็น β^0 thalassemia

จะพบเพียง Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) ประมาณร้อยละ 2-5 และ Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) ประมาณร้อยละ 95-98 เท่านั้น แต่ถ้าเป็น β^+ thalassemia จึงจะพบ Hb A ($\alpha_2\delta_2$) ร่วมด้วยประมาณร้อยละ 10-30 ส่วน Hb A2 ยังคงพบได้ประมาณร้อยละ 2-5 เท่าเดิม ส่วน Hb F ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 70-90[11]

ผลการตรวจ Hb electrophoresis ในผู้ใหญ่ปกติจะได้ผลเป็น Hb A_2A โดยพบ Hb A_2 ประมาณร้อยละ 2.5-3.5 % ถ้า Hb A_2 >3.5 % แสดงว่าเป็น β thalassemia trait ค่านี้ใช้ได้ทั้งในคนทั่วไป และในหญิงตั้งครรภ์[12] ยกเว้นชาวตะวันตก ที่พบว่าหญิงตั้งครรภ์บางรายสามารถมี Hb A_2 > 3.5 % โดยที่ไม่ได้เป็นโรค thalassemia trait แต่อย่างใด[13] ในผู้ที่มี beta thalassemia trait ถ้ามี alpha-thalassemia-1 trait สมทบด้วยสัดส่วนของ Hb A_2 จะลดลงได้บ้างเล็กน้อย แต่ก็ยังคงสูงกว่าค่าของคนปกติเป็นส่วนใหญ่ นั่นคือเฉลี่ยจาก 6.1 % เหลือเป็น 5.3 %[14] ดังนั้นเมื่อทำ Hb electrophoresis แล้วพบเป็น Hb A_2A และ Hb A_2 > 3.5 % แล้วสรุปว่าเป็นเพียง beta thalassemia trait นั้น ต้องไม่ลืมว่าผู้ป่วยอาจจะมี alpha thalassemia-1 แฝงร่วมด้วยก็ได้

ในทำนองเดียวกัน ถ้าผู้ที่เป็น beta thalassemia trait มีโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กร่วมด้วย สัดส่วนของ Hb A2 จะลดลงได้บ้างเช่นกัน เหลือประมาณร้อยละ 3.8-7.0 หรือเฉลี่ย 5.4$\pm$0.86 % เมื่อให้การรักษาด้วยเหล็กเพียงพอแล้ว สัดส่วนของ Hb A_2 จะขยับเพิ่มเป็น 5.8$\pm$0.87 %[15] แต่ก็มีผู้ป่วยบางรายที่มีค่าร้อยละของ Hb A_2 เท่าคนปกติ ดังนั้นถ้าพบผู้ป่วยเป็น iron deficiency anemia ตั้งแต่ต้น จึงไม่ได้ตัดสิทธิ์ผู้ป่วยว่าจะไม่สามารถเป็น beta thalassemia trait ได้[16] ผู้ป่วยกลุ่มนี้ต้องให้การรักษาด้วยการให้ยาเข้าธาตุเหล็ก ต่อเมื่อหายจากอาการซีดแล้วค่อยตรวจซ้ำ ถ้าผู้ป่วยเป็น beta thalassemia trait อยู่เดิม ร้อยละของ Hb A2 จึงจะมากกว่าร้อยละ 3.5 ให้เห็น

ในทางตรงข้าม การตรวจได้ Hb A2A ในผู้ใหญ่ ถ้าร้อยละของ Hb A2 ลดลงเล็กน้อย ร่วมกับค่า MCV ที่ต่ำกว่า 80 fL ก็ชวนให้สงสัยว่า จะมี alpha thalassemia 1 แฝงได้ กล่าวคือ Hb A_2 สามารถลดลงได้เล็กน้อยจากร้อยละ 2.54 $\pm$ 0.5 ในคนปกติ เป็นร้อยละ 2.07 $\pm$ 0.6 ในกลุ่มผู้ที่มี alpha thalassemia 1 แฝง[17] อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัย alpha thalassemia 1 แฝงที่ถูกต้องและเหมาะสม คงต้องใช้การตรวจยีนส์โดยตรงดีกว่า เช่น วิธี PCR

ผู้ที่มี alpha thalassemia-1[18] แฝงก็มีสิทธิ์ที่จะเป็น iron deficiency anemia ร่วมด้วยได้เช่นเดียวกับคนปกติ ซึ่งผู้ที่มี alpha thalassemia-1 แฝง ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กร่วมด้วยหรือไม่ก็ตาม ผลการตรวจ Hb electrophoresis จะบอกอะไรไม่ได้เลย ยิ่งกว่านั้น การตรวจพบโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก ตั้งแต่ต้น เช่น พบว่าผู้ฝากครรภ์มีค่า MCV ต่ำร่วมกับ ferritin ต่ำ serum iron ต่ำ แต่ TIBC ขึ้น ก็อาจจะทำให้แพทย์ชะล่าใจได้ว่าค่า MCV ที่ต่ำในรายนั้น ๆ เกิดเพราะการขาดธาตุเหล็กนี่เอง อาจจะทำให้ละเลยต่อการตรวจหา alpha-thalassemia-1 แฝงต่อไป

ในกรณีตรวจ Hb electrophoresis ด้วยวิธี HPLC จะทำให้ band ของ Hb A_2 วิ่งทับกับ band ของ Hb E นักเทคนิคการแพทย์จะแยก Hb ทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันอย่างง่าย ๆ โดยการดูร้อยละเป็นหลัก กล่าวคือ ถ้าน้อยกว่าร้อยละ 10 ก็ถือว่าเป็น Hb A_2 ถ้ามากกว่าร้อยละ 10 ก็เรียกว่า Hb E และถ้าค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 10-50 ก็แปลว่าเป็น Hb E trait ถ้ามากกว่าร้อยละ 80 ก็แปลว่า เป็น Hb E disease

ในผู้ป่วย Hb E disease นอกจากจะตรวจพบ Hb E เป็นส่วนใหญ่แล้วอาจจะพบมี Hb F เพิ่มมากกว่าร้อยละ 1 ได้บ้าง เช่น อาจจะขึ้นได้ถึงร้อยละ 13.4 ในผู้ป่วยผู้ใหญ่[19] ส่วนในผู้ป่วยเด็ก อาจจะพบมากกว่านี้ก็ได้ ในรายที่มี Hb F มากเช่นนี้ อาจจะต้องตรวจยืนยันว่าเป็น Hb E disease จริง ๆ ไม่ใช่โรค beta thalassemia/Hb E ซึ่งมักมีอาการทางคลินิกที่รุนแรงกว่า ไม่ว่าจะโลหิตที่จางรุนแรงกว่า ตับม้ามโตมากกว่า ด้วยการส่งตรวจ PCR for beta thalassemia ถ้าให้ผลบวกก็แปล

ว่า ผู้ป่วยเป็น beta thalassemia / Hb E จริง ไม่ใช่ Hb E disease

ในทางตรงข้าม ผู้ป่วยที่เป็น beta thalassemia / Hb E เมื่อตรวจ Hb electrophoresis จะได้ผลเป็น Hb E และ Hb F อย่างละครึ่งโดยประมาณเป็นหลัก ส่วนจะมี Hb A ด้วยหรือไม่ก็ขึ้นอยู่กับว่าผู้ป่วยเป็น beta zero หรือเป็น beta plus ถ้าเป็น beta plus ก็จะพบ Hb A ร่วมด้วยได้ และอีกอย่างที่จะต้องระวังคือผู้ป่วยเป็น beta zero ก็จริง แต่ได้รับเลือดคนปกติที่เป็น Hb A_2A มาก่อน ดังนั้นการแปลผลผู้ป่วยที่มี Hb E และ Hb F จึงต้องแปลร่วมกับอาการของผู้ป่วยเสมอ ในรายที่เป็น beta thalassemia / Hb E อาการโลหิตจางมีความรุนแรงได้แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย ตั้งแต่ไม่มีอาการเลยจนถึงอาการรุนแรงถึงขั้นต้องให้เลือดทุกเดือนก็ได้ โดยค่า Hb concentration จะอยู่ระหว่าง 4.2 ถึง 12.6 g%[20] ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีโลหิตจางมาก แต่ส่วนน้อย อาจจะมี Hb concentration ได้ถึง 12 g% ก็มี และร้อยละของ Hb F พบได้ระหว่าง 10 ถึง 80 %[21] รายที่ร้อยละของ Hb F สูงไม่มากนี้ จะพบได้ในผู้ที่มี alpha thalassemia แฝงร่วมด้วย หรือสูงอายุ หรือความสามารถในการสร้างสาย gamma G ได้น้อยกว่าปกติ จึงอาจกล่าวได้ว่าระหว่าง homozygous Hb E หรือ Hb E disease และ beta thalassemia / Hb E ปริมาณของ Hb F ในบางครั้งก็ไม่ช่วยในการแยก ถ้าจำเป็นก็ต้องตรวจ PCR for beta thalassemia เพิ่มเติม และในทั้ง 2 กรณี ก็อาจจะมียีนส์ alpha thalassemia-1 แฝงอยู่ด้วยได้ทั้งคู่ โดยไม่มีอาการแสดงใด ๆ จะเตือน ให้ทราบได้

ในประเทศไทย เคยมีรายงานผู้ป่วย beta thalas-semia / Hb E ที่มีสัดส่วนของ Hb F ต่ำมาก ประมาณร้อยละ 1.8-4.8 หรือ เฉลี่ย 3.4 $\pm$ 1.5 % โดย beta thalas-semia genes ส่วนใหญ่เป็นชนิด -31 (A->G) โดยผู้ป่วย ส่วนใหญ่ไม่มี alpha thalassemia-1 genes[22] ดังนั้น การดูสัดส่วนของ Hb F เพียงอย่างเดียวคงไม่พอที่จะใช้แยกระหว่าง beta thalassemia / Hb E กับ Hb E disease ในบางกรณี

ในผู้ที่เป็น hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) ซึ่งเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ร่างกายไม่ยอมเปลี่ยนจาก Hb F ไปเป็น Hb A หลังคลอดแบบคนปกติทั่วไป จึงยังคงมี Hb หลักเป็น Hb F แบบทารกแรกเกิด เมื่อยีนส์นี้ได้รับการถ่ายทอด ร่วมกับยีนส์ของ Hb E trait ก็จะให้ผลการตรวจ Hb electrophoresis เป็นแบบมีเพียง Hb E และ Hb F เท่านั้นเช่นกัน แต่ผู้ป่วยประเภทนี้ จะไม่มีอาการ โลหิตจาง มีเพียงค่า MCV ต่ำลงเล็กน้อยเท่านั้น[23]

การมียีนส์ alpha thalassemia-1 trait ในผู้ที่เป็น Hb E trait ทำให้ร้อยละของ Hb E มีน้อยลง เช่น ลดจากร้อยละ 12.3-35.0 (เฉลี่ย 23.3$\pm$3.1%) เหลือเพียง 11.6-32.0 (เฉลี่ย 17.0$\pm$3.7%) แต่การที่ร้อยละของ Hb E ไม่ลดไม่ได้แปลว่าไม่มี alpha-thalassemia-1 genes แฝงอยู่ เพราะมีถึงร้อยละ 3 ของผู้ที่มียีนส์ทั้ง alpha thalassemia-1 trait รวมกับ Hb E trait ที่พบว่ามี Hb E มากกว่าร้อยละ 25[24] ถ้าคู่สมรสเป็น Hb E แฝงประเภทนี้ ก็ถือว่าเป็นคู่เสี่ยงในการจะได้ทารกที่เป็น Hb Bart hydrops fetalis ได้ ดังนั้นถ้าต้องการความมั่นใจ ต้องตรวจหายีนส์ alpha thalassemia-1 แฝงทุกรายที่เป็น Hb E trait ไม่ว่าร้อยละของ Hb E จะเป็นเท่าใดก็ตาม

ถ้าผู้ป่วย Hb E disease มี alpha thalassemia-1 genes ร่วมด้วย ค่าความเข้มข้น Hb และดัชนีของเม็ดเลือดแดง จะไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่มี alpha thalassemia-1 genes แฝงแต่อย่างใด[19] ดังนั้นเมื่อพบผู้ที่มี Hb E ไม่ว่าจะเป็น trait หรือ disease[25] ก็ตาม จะไม่สามารถบอกได้เลยว่า มีหรือไม่มี alpha thalassemia-1 genes แฝงอยู่ด้วยหรือไม่ ทางเดียวที่จะรู้ได้แน่นอน คือการตรวจ PCR for alpha thalassemia-1 genes โดยตรงเท่านั้น

หากตรวจพบระดับของ Hb A_2 มากกว่าร้อยละ 3.5 ในผู้ที่ไม่มีภาวะโลหิตจาง แสดงว่าเป็นพาหะของ b thalassemia เนื่องจากในการตรวจ Hb electrophoresis ด้วยวิธี HPLC ซึ่งใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการของกรมอนามัย รวมทั้งศูนย์อนามัยแม่และเด็กทั้งหลายนั้น

ตำแหน่งของ Hb E และ Hb A2 วิ่งทับที่เดียวกัน การที่จะบอกว่าเป็นชนิดใด ขึ้นกับปริมาณที่ตรวจพบ ในผู้เป็นพาหะ ของ Hb E ควรตรวจพบ Hb E ประมาณร้อยละ 25-35 หากพบว่ามีปริมาณของ Hb E น้อยกว่าร้อยละ 25 นอกจากจะต้องสงสัยว่าผู้ป่วยมี a thalassemia-1 แฝง แล้วโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กก็อาจจะทำให้สัดส่วนของ Hb E ลดลง ได้เล็กน้อยเช่นกัน

เนื่องจากยีนส์ที่ควบคุมการสร้างสาย alpha และ beta globin อยู่กันคนละโครโมโซมกัน ดังนั้น ผู้ที่เป็น Hb E disease หรือ beta-thalassemia / Hb E disease ซึ่งเป็นความผิดปกติของสายเบต้า อาจจะมี Hb H disease ที่เป็นความผิดปกติของสายแอลฟ่า ถูกถ่ายทอดร่วมมา ด้วยได้ในคนเดียวกัน ถ้าตรวจ Hb electrophoresis จะพบ Hb E, Hb F และ Hb Bart หรืออาจจะพบเพียง Hb EE และ Hb Bart ก็ได้ เรียกโรคนี้ว่า Hb EFBart disease ส่วนผู้ที่เป็น Hb E disease หรือ beta-thalassemia / Hb E disease ที่ถ่ายทอดร่วมกับ Hb H-CS disease ก็จะตรวจพบ Hb E, Hb F, Hb Bart และ Hb CS หรือ Hb EE, Hb Bart และ Hb CS เรียกว่าเป็น Hb EFBart-CS disease[26] ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มนี้ จะมีอาการซีดปานกลาง โดยค่าความเข้มข้นของ Hb อยู่ระหว่าง 6.1-10.4 g% สัดส่วนของ Hb E พบได้ประมาณร้อยละ 85[27] ตรวจร่างกายพบตับ ม้ามโตได้ แต่ไม่มาก และก็เช่นเดียวกับ Hb H และ Hb H-CS disease นั่นคือ อาจจะมีภาวะ hemolytic crisis เวลามีไข้หรือ oxidation stress อื่น ๆ จนต้องมีการ เติมเลือดเป็นครั้งคราวได้ ทั้ง ๆ ที่ในสภาพทั่ว ๆ ไป อาจจะไม่มีความจำเป็นต้องเติมเลือด

ผู้ป่วยที่เป็น Hb E trait ร่วมกับ Hb H disease จะตรวจ Hb electrophoresis พบ Hb A, Hb E และ Hb Bart จึงนิยมเรียกว่าเป็นโรค Hb AEBart disease และถ้าผู้ป่วยเป็น Hb E trait ร่วมกับ Hb H-CS disease จะตรวจพบ Hb A, Hb E, Hb Bart และ Hb CS เรียกว่าเป็น Hb AEBart-CS disease สัดส่วนของ Hb E พบได้ ประมาณร้อยละ 13-15[27] ผู้ป่วยจะมีอาการซีดปานกลาง ค่าเฉลี่ย Hb ในช่วงปกติประมาณ 9.1±1.1 g%, MCV 60±3 fL สำหรับกลุ่ม Hb AEBart และ 8.0±0.9 g%, MCV 67±4 fL สำหรับกลุ่ม Hb AEBart-CS[28] ตับม้ามโตได้บ้าง และก็เช่นเดียวกันกับ Hb H และ Hb H-CS ที่อาจจะมีภาวะ hemolytic crisis แทรกซ้อนได้เป็นครั้งคราวเมื่อได้รับ oxidative stress เช่น ไข้ขึ้นสูง อาจจะต้องถึงกับเติมเลือดได้

เนื่องจาก Hb H, Hb Bart ค่อนข้างไม่เสถียร ในผู้ป่วยที่มี Hb ทั้งสองนี้ เมื่อทำการตรวจ Hb electrophoresis อาจจะตรวจไม่พบ band ได้ ถ้าตัวอย่างเลือดนั้นถูกเก็บเพื่อรอการตรวจหลายวัน จน Hb ทั้งสองสลายตัวไปหมดแล้ว ดังนั้นในผู้ป่วยที่มีอาการซีดปานกลาง MCV ต่ำ MCH ก็ต่ำ แล้วตรวจพบเพียง Hb A และ Hb E เท่านั้น ก่อนที่จะสรุปว่าผู้ป่วยเป็นเพียง Hb E trait ร่วมกับภาวะโลหิตจางจากสาเหตุอื่น ให้สังเกตสัดส่วนระหว่าง Hct ต่อ Hb ถ้ามากกว่า 3.25 ขึ้นไป หรือ เฉลี่ย 3.5±0.2 ให้สงสัยว่าผู้ป่วยจะเป็น Hb AEBart disease[29] ไม่ใช่ Hb E trait แล้วซ้ำเติมด้วยภาวะโลหิตจางจากสาเหตุต่าง ๆ เพราะเป็นที่รู้กันทั่วว่า ลำพัง Hb E จะไม่มีโลหิตจาง และส่วนมาก MCV ก็มักจะปกติไปด้วย และก็เช่นเดียวกันกับ Hb AEBArt-CS disease ที่อาจจะตรวจพบเพียง Hb E และ Hb CS เท่านั้นก็ได้ผู้เชี่ยวชาญบางท่านแนะนำให้ดูสัดส่วนของ Hb E ก็ได้ ถ้า Hb E ประมาณร้อยละ 13-15 แสดงว่าอาจจะเป็น Hb AEBart ไม่ใช่ Hb E trait ธรรมดาด้วยข้อสังเกตเหล่านี้ ทำให้มีเหตุผลในการที่จะตรวจยืนยันว่า มียีนส์ alpha-thalassemia-1 และ alpha-thalassemia-2 แฝงอยู่ด้วย หรือไม่

นอกจากจะสลายง่ายแล้ว ในการตรวจ Hb electrophoresis นั้น band ของ Hb H จะบางเป็นพิเศษ ถ้าผู้ป่วยโลหิตยิ่งจาง เช่น จากการที่มีภาวะแทรกซ้อนจากการขาดธาตุเหล็ก band ของ Hb H จะเลือนหายไปเลย ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยโรค Hb H ได้ จนกว่าจะมีการให้การรักษาด้วยยาเข้าธาตุเหล็ก จนเพียงพอ แล้วตรวจ Hb electrophoresis ซ้ำ จึงจะพบ band ของ Hb H ได้[30]

ดังนั้นเพื่อความไม่ประมาทในการรักษาผู้ป่วยโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็ก เมื่อรักษาจนเหล็กเพียงพอแล้ว ถ้าผู้ป่วยยังไม่หายสนิทภายใน 1-2 เดือน เช่น Hb ยังไม่ขึ้นจนถึงระดับปกติ หรือปกติแล้วแต่ค่า MCV ยังต่ำอยู่ อาจจะต้องมีการตรวจ Hb electrophoresis ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อจะได้ไม่พลาดผู้ที่เป็น beta-thalassemia trait และ Hb H disease ที่ถูกโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กบดบังตั้งแต่ต้น

ผู้ที่เป็นพาหะของ Hb constant spring (Hb CS) จะตรวจพบ Hb CS ร้อยละ 1-2 ส่วนผู้ที่เป็น homozygous Hb CS จะตรวจพบ Hb CS ร้อยละ 5-10 ผู้ป่วยมักจะมีอาการซีดเพียงเล็กน้อย หรือไม่มีอาการซีดก็ได้ แม้แต่ค่า MCV ก็อาจจะปกติได้ในผู้ป่วยบางราย[31,32] ดังนั้นถ้าพบผู้ป่วยมีอาการซีดปานกลาง ตรวจพบเพียง Hb A และ Hb CS เล็กน้อย อาจจะต้องพยายามตรวจหา Hb H-CS disease ง่าย ๆ ก็ด้วยการดูสัดส่วนของ Hct/Hb ซึ่งถ้าเป็น Hb H-CS disease จริง จะได้ค่าสัดส่วนใกล้เคียงกับ 3.5$\pm$0.2 แต่ในที่สุดก็ต้องตรวจ PCR เพื่อหา a-thalassemia-1 genes อยู่ดีเพื่อความแม่นยำ

ผู้ที่เป็นพาหะของ a-thalassemia-2 จะไม่พบความผิดปกติใด ๆ จากการตรวจ CBC และ Hb electrophoresis การวินิจฉัยทำได้โดยอาศัยการตรวจวิเคราะห์ยีนส์ หรืออาศัยหลักการศึกษาทางพงศาวลีเข้าช่วย (กฎของเมนเดล) เช่น ถ้าผู้ป่วยเป็น Hb H disease บิดาและมารดาผู้ป่วยจะต้องเป็นผู้ถ่ายทอดยีนส์ a-thalassemia-1 และยีนส์ a-thalassemia-2 ให้แก่ผู้ป่วย หากคนใดคนหนึ่งมีผลการตรวจที่เข้าได้กับพาหะของ a-thalassemia-1 เช่น MCV น้อยกว่า 80 fL, ตรวจพบ OF ให้ผลบวก และตรวจ PCR ให้ผลบวกโดยที่ค่า Hb concentration มักปกติ อีกคนที่เหลือก็ต้องเป็นพาหะของ a-thalassemia-2 ถึงแม้จะมีผลการตรวจทางโลหิตวิทยา เช่น MCV, MCH, และ Hb concentration ปกติก็ตาม

ต่อไปนี้เป็นตัวอย่างการแปลผลการตรวจ Hb electrophoresis

1. ผลเลือดของคนไข้รายหนึ่งเป็นชายไทย ไม่ทราบอายุ ผลที่ได้เป็นดังนี้ Hb typing: A_2FA, Hb A = 61%, Hb F = 35 %, HbA_2 = 4 %

ผู้ป่วยไม่ทราบอายุ สันนิษฐานว่า Hb typing นี้น่าจะใช้วิธี HPLC หรือ LPLC การมีข้อมูลเพียงผล Hb typing อย่างเดียว ควรจะต้องคิดถึงภาวะ 3 อย่างต่อไปนี้

1.1. Newborn ซึ่งโดยทั่วไป NB มักจะมี Hb electrophoresis เป็น A_2FA แต่ใน newborn ปริมาณ HbA_2 จะต่ำมากไม่ใช่ 4% เช่นนี้ ดังนั้น กรณีนี้ แม้ไม่ทราบอายุก็พอจะสันนิษฐานได้ว่าไม่น่าจะใช่ newborn

1.2. Homozygous β^O-thalassemia, post recent blood transfusion โดยทั่วไปมักพบปริมาณ $Hb A_2$ สูงได้ เล็กน้อย และรูปร่างเม็ดเลือดแดงใน peripheral blood smear มักเป็น double population กล่าวคือเป็น bizarre shape (poikilocytosis) แบบ thalassemic blood picture ผสมปนเปไปกับ normal morphology ของเม็ดเลือดแดง จากเลือดที่ได้รับมาจากผู้ให้

1.3. Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) ภาวะนี้การสร้าง Hb F ยังคงมีอยู่อย่างเข้มข้น แม้ว่าอายุจะพ้น 1 ขวบไปแล้วก็ตาม ซึ่งปกติแล้วการสร้าง Hb F จะลดเหลือประมาณร้อยละ 1 หลังจากคนทั่วไป อายุได้ 2 ปี ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะไม่มีอาการทางคลินิก ค่า Hb concentration ประมาณ 12.3$\pm$1.4 g%, MCV 79.9$\pm$6.8 fL, MCH 25.7$\pm$2.2 pg และการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างของเม็ดเลือดแดงก็ไม่ชัด[33] มี 2 ชนิด ได้แก่ pancellular และ heterocellular HPFH พวก pancellular HPFH มักให้ผลตรวจ Hb electrophoresis เหมือนผู้ป่วยรายนี้ และตรวจ acid elution test ได้ F cell 100% ในขณะที่ heterocellular HPFH มักพบ F cells เพียงเล็กน้อย (ไม่ถึง 100%) ผล Hb electrophoresis ของผู้ป่วยรายนี้เข้าได้กับกรณี pancellular HPFH ชนิดที่เกิดจาก point mutations ที่ promoter regions ของ γ-globin genes มากที่สุด เพราะ HbA2 ยังคงมีอยู่

จากผล Hb electrophoresis เป็นไปได้ที่ผู้ป่วยจะเป็น homozygous β^{o}-thalassemia, post blood transfusion หรือเป็น pancellular HPFH ชนิดที่เกิดจาก point mutations ที่ promoter regions ของ γ-globin genes การแยกภาวะทั้งสอง นอกจากจะดูอาการทางคลินิกซึ่งควรจะแตกต่างกันอย่างชัดเจนแล้ว สามารถดูจากผลตรวจ CBC ด้วยก็ได้ ซึ่ง HPFH จะให้ผล normal CBC ในขณะที่ homozygous β^{o}-thalassemia มักจะให้ผล abnormal CBC โดยมีภาวะ anemia ชัดเจนและพบ double red cell population ดังกล่าวแล้ว

2. ผลตรวจ Hb electrophoresis: Hb AEFBart, Hb A 45 %, Hb E 24 %, Hb F 25 %, Hb Bart 2 %

2.1. ในการแปลผล ถ้าเห็น Hb Bart ในผู้ใหญ่ แปลว่าต้องมี Hb H (alpha-thalassemia-1 และ alpha-thalassemia-2 double heterozygosities ของสายแอลฟ่าแน่ ๆ ถ้าเห็น Hb E แปลว่าสายเบต้าอย่างน้อยหนึ่งข้างมี Hb E อยู่ ถ้ามี Hb A อยู่แปลว่า ผู้ป่วยยังคงสร้างสายแอลฟ่า และเบต้าได้บ้างบางส่วน สายเบต้าขาที่เหลือจึงต้องเป็น Ⲃ(+) thalassemia gene จึงรวมเป็น Ⲃ(+) thalassemia / hemoglobin E disease บวกกับ Hb H disease ของสายแอลฟ่ารวมแล้ว เรียกโรคนี้ว่า Hb EFBart disease

2.2. ถ้าผู้ป่วยเป็น Ⲃ(0) thalassemia / hemoglobin E disease ร่วมกับ Hb H disease ซึ่งจะสร้างสายเบต้าโกลบินไม่ได้เลย จึงไม่สามารถสร้าง Hb A ได้เอง การพบ Hb A จึงแปลว่าต้องได้มาจากการได้รับเลือด ของผู้อื่นภายใน 3 เดือน โดยทั่วไปผู้ป่วยโรค Hb EFBart disease มักจะแสดงผลการตรวจเป็น Hb E, Hb F และ Hb Bart เป็นหลัก มักตรวจไม่ค่อยพบ Hb H เนื่องจากปริมาณที่มีไม่มาก และความไม่เสถียรของ Hb H เอง

2.3. ผู้ป่วยอาจจะเป็น Hb H disease ร่วมกับ Hb E disease ซึ่งผลการตรวจจะได้เพียง Hb E, Hb F และ Hb Bart เท่านั้น ไม่มีสายเบต้าโกลบินเลย จึงไม่สามารถสร้าง Hb A ได้ การตรวจพบ Hb A จึงต้องเกิดจากการได้รับเลือดผู้อื่น

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairuam V. Beta-thalassemia associated with alpha-thalassemia in Thailand. Hemoglobin 1988; 12(5-6): 581-92.
2. กุลนภา ฟู่เจริญ. การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัย ธาลัสซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น พิมพ์ครั้งที่ 1, 2552.
3. Nagai M, Yoneyama Y. Reduction of methemoglobins M Hyde Park, M Saskatoon and M Milwaukee by ferredoxin and ferredoxin-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reductase system. J Biol Chem 1983; 258: 14379-84.
4. Hardison RC, Chui DH, Reimer C, Giardine B, Lehvaslaiho H, Wajcman H, et al. Database of human hemoglobin variants and other resources at the globin gene server. Hemoglobin 2001; 25(2): 183-93.
5. Srivorakun H, Fucharoen G, Puangplruk R, Kheawon N, Fucharoen S. Complex interaction of hemoglobin (Hb) Nakhon Ratchasima [α63(E12)Ala'!Val], a novel α2-globin chain variant with Hb E [β26(B8) Glu'!Lys] and a deletional α(+)-thalassemia. Eur J Haematol 2011; 87: 68-72.
6. Liao C, Wei J, Li Q, Li J, Li L, Li D. Nonimmune hydrops fetalis diagnosed during the second half of pregnancy in Southern China. Fetal Diagn Ther 2007; 22: 302-5.
7. Yang YH, Teng RJ, Tang RJ, Yau KI, Huang LH, Hsieh FJ. Etiology and outcome of hydrops fetalis. J Formos Med Assoc 1998; 97: 16-20.
8. Ratanasiri T, Komwilaisak R, Sittivech A, Kleebkeaw P, Seejorn K. Incidence, causes and pregnancy outcomes of hydrops fetalis at Srinagarind Hospital, 1996-2005: a 10-year review. J Med Assoc Thai 2009; 92: 594-9.
9. Sutcharitchan P, Wang W, Settapiboon R, Amornsiriwat S, Tan ASC Chong SS. Hemoglobin H disease classification by isoelectric focusing: Molecular verification of 110 cases from Thailand. Clin Chem 2005; 51: 641-4.
10. Jindadamrongwech S, Wisedpanichkij R, Bunyaratvej

A, Hathirat P. Red cell parameters in alpha-thalassemia with and without beta-thalassemia trait or hemoglobin E trait. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; Suppl 3: 97-9.

11. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genet Med 2010; 12: 61-76.
12. Ou Z, Li Q, Liu W, Sun X. Elevated hemoglobin A2 as a marker for : thalassemia trait in pregnant women. Am J lin Pathol 2009; 131(1): 42-8.
13. Yang Z, Chaffin CH, Easley PL, Thigpen B, Reddy VV. Prevalence of elevated hemoglobin A2 measured by the CAPILLARYS system. Am J Clin Pathol 2009; 131(1): 42-8.
14. Sae-ung N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Alpha0 thalassemia and related disorders in northeast Thailand: a molecular and hematological characterization. Acta Hematol 2007; 117: 78-82.
15. Verma S, Gupta R, Kudesia M, Mathur A, Krishan G, Singh S. Coexisting iron deficiency anemia and beta thalassemia trait: Effect of iron therapy on red cell parameters and hemoglobin subtypes. ISRN Hematology, 2014, Article ID 293216, 5 pages, 2014. doi:10.1155/2014/293216
16. Madan N, Sikka M, Sharma S, Rusia U. Phenotypic expression of hemoglobin A2 in beta-thalassemia trait with iron deficiency Annals of Hematol 1998; 77(3): 93-6.
17. พิพัฒน์ ทองน้อย. การใช้ค่าพารามิเตอร์เม็ดเลือดแดง และ ปริมาณ hemoglobin E ทำนายการพบยีนชนิดอัลฟ่า 1. ขอนแก่นเวชสาร 2551; 32(suppl 2): 81-9.
18. Hinchliffe RF, Lilleyman JS. Frequency of coincident iron deficiency and beta-thalassaemia trait in British Asian children. J Clin Pathol 1995; 48(6): 594-595.
19. Tachavanich K, Viprakasit V, Chinchang W, Glomglao W, Pung-amritt P, Tanphaichitr VS. Clinical and hema-tological phenotype of homozygous hemoglobin E: Revisit of a benign condition with hidden reproductive risk. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009; 40: 306-16.
20. Winichagoon P, Thonglairoam V, Fucharoen S, Wilairat P, Fukumaki Y, Wasi P. Br J Haematol. Severity dif-ferences in beta-thalassaemia / haemoglobin E syndromes: implication of genetic factors. Br J Haematol 1993; 83(4): 633-9.
21. Rees DC. Hemoglobin F and Hemoglobin E/[beta]-Thalassemia J Ped Hematol/Oncol 2000; 22(6): 567-72.
22. พีระพล วอง, ปริศนา เจริญพร, แน่งน้อย เจิมนิ่ม, ต่อพงศ์ สงวนเสริมศรี. รายงานผู้ป่วย β-thalassemia / Hemoglobin E 5 ราย ซึ่งมีปริมาณ Hemoglobin F น้อย. วารสารโลหิต วิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2549; 16: 323-6.
23. Fucharoen S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Surapot S. Molecular characterization of thalassemia intermedia associated with HPFH-6/beta-thalassemia and HPFH-6/Hb E in Thai patients. Acta Haematol 2002; 108: 157-61.
24. Charoenkwan P, Wanapirak C, Thanarattanakorn P, Sekararithi R, Sae-Tung R, Sittipreechacharn S, et al. Hemoglobin E levels in double heterozygotes of hemoglobin E and SEA-type alpha-thalassemia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36(2): 467-70.
25. Fucharoen G, Trithipsombat J, Sirithawee S, et al. Molecular and hematological profiles of hemoglobin EE disease with different forms of alpha-thalassemia. Ann Hematol 2006; 85(7): 450-4.
26. คู่มือการตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณฮีโมโกลบิน ศูนย์วิจัยทางคลินิกกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พิมพ์ครั้งที่ 1 ตุลาคม 2553 บริษัท หมัดเด็ด จำกัด กรุงเทพฯ
27. Fucharoen S, Winichagoon P. Haemoglobinopathies in Southeast Asia. Indian J Med Res 2011; 134: 498-506.
28. Vichinsky E. Hemoglobin E syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007: 79-83.
29. Insiripong S, Supattarobol T, Jetsrisuparb A. Comparison of hematocrit/hemoglobin ratios in subjects with alphathalassemia, with subjects having chronic kidney disease and normal subjects. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2013; 44: 707-11.
30. สมชาย อินทรศิริพงษ์ วัชรินทร์ ยิ่งสิทธิ์สิริ จุรี

บุญดำรงสกุล. โลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กในผู้ป่วยโรค Hemoglobin H: รายงานผู้ป่วย 1 ราย. โปสเตอร์ใน การประชุม สัมมนาวิชาการธาลัสซีเมียแห่งชาติครั้งที่ 20 เรื่อง “Action Plan for Thalassemia” 17-19 ธันวาคม 2557, กรุงเทพฯ

31. Insiripong S, Yingsitsiri W, Boondumrongsagul J, Noiwatanakul J. Prevalence of thalassemia traits in people without anemia or microcytosis. J Hematol Transfus Med 2014; 24: 25-9.
32. Insiripong S, Yingsitsiri W, Boondumrongsagoon J. Thalassemia and hemoglobinopathy despite normal level of hemoglobin concentration and normal mean corpuscular volume. Bull Department Med Service 2012; 37; 215-21.
33. Panyasai S, Fucharoen S, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular basis and hematologic characterization of db-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in Thailand. Haematologica 2004; 9: 777-81.