

นิพนธ์ต้นฉบับ

แอนติเจนหมู่เลือดระบบ Lewis บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงและในน้ำลายของผู้บริจาคโลหิตไทย

ภุรยา โอวาทกา กัลยา เกิดแก้วงาม สารีกา เมฆฉาย จินตนา ทับรอด และ พิมล เชี่ยวศิลป์
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

ความเป็นมา แอนติเจนหมู่เลือดระบบ Lewis มีความหลากหลายในการแสดงออกสูง เนื่องจากเป็นแอนติเจนในพลาสมา แล้วถูกเม็ดเลือดแดงดูดซับมาอยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง มีความเกี่ยวข้องใกล้เคียงกับยีน ABH secretor การระบุ phenotype ของหมู่เลือดระบบ Lewis เป็นเรื่องยากในผู้บริจาคโลหิตบางราย เนื่องจาก cross-reactivity ของแอนติซีรัมชนิดโมโนโคลนัลของบริษัทผู้ผลิต สารหมู่เลือด Lewis อาจตรวจได้ในน้ำลายของผู้บริจาคโลหิตบางราย **วัตถุประสงค์** เพื่อทดสอบความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจแอนติเจน Lewis บนผิวเม็ดเลือดแดงและการตรวจสาร Lewis ในน้ำลาย **วัสดุและวิธีการ** ตัวอย่างเลือดและน้ำลายจากผู้บริจาคโลหิตจำนวน 206 ราย ระหว่างวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 ถึง 26 สิงหาคม พ.ศ. 2559 น้ำลายหลังจากทำการต้มในน้ำเดือด นำมาปั่นแยกเอาน้ำใสข้างบนเก็บแช่แข็งที่ -30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดสอบ ตรวจสาร Lewis ในน้ำลายด้วยวิธี hemagglutination inhibition test (HAI) ตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี hemagglutination **ผลการศึกษา** Phenotype ของหมู่เลือด Lewis บนผิวเม็ดเลือดแดงและสาร Lewis ในน้ำลายจากจำนวน 206 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม secretor ตรวจพบ phenotype ได้ 2 แบบ คือ Le (a-b+) และ Le (a-b-) ในผู้ที่มี Le (a-b+) จำนวน 118 ราย ซึ่งมีจำนวน 101 ราย ที่หลังทั้งสาร Le^a และ Le^b ในน้ำลาย อีก 17 ราย พบแต่สาร Le^b เท่านั้น และพบ Le (a-b-) ซึ่งไม่พบสาร Lewis ในน้ำลายจำนวน 28 ราย สำหรับกลุ่ม non secretor พบ phenotypes 2 แบบ คือ phenotypes Le (a+b-) และ Le (a-b-) พบคนที่เป็น Le (a+b-) ที่หลังทั้งสาร Le^a ในน้ำลาย 48 ราย และเป็น Le (a-b-) 8 ราย ที่ไม่พบสาร Lewis ในน้ำลาย สำหรับกลุ่มที่หลังสาร ABH อ่อน ที่พบในการศึกษา 4 ราย มี phenotype เป็น Le (a+b+) 3 ราย ที่หลังทั้งสาร Le^a และ Le^b ในน้ำลาย อีก 1 ราย หลังสาร Le^a ชนิดเดียว ผลที่ได้สอดคล้องกับทฤษฎี คือ ผู้ที่มี phenotype บนเม็ดเลือดแดงเป็น Le (a+b-) เป็น ABH non-secretor ผู้ที่มี phenotype บนเม็ดเลือดแดงเป็น Le (a-b+) จะเป็น ABH (secretor) ผู้ที่มี phenotype บนเม็ดเลือดแดงเป็น Le (a-b-) จะเป็น ABH (secretor) หรือ ABH (non-secretor) ก็ได้ ผู้ที่มี phenotype บนเม็ดเลือดแดงเป็น Le (a+b+) เป็น weak ABH secretor **สรุป** เมื่อผลการตรวจ Lewis phenotype จากเม็ดเลือดแดงไม่สามารถแปลผลได้ชัดเจน ควรตรวจ Lewis substance ในน้ำลาย สำหรับผู้บริจาคโลหิตบางรายที่ได้ผลจากทั้งสองวิธีไม่สอดคล้องกัน ควรใช้วิธีการตรวจในระดับโมเลกุลเพิ่มเติม

คำสำคัญ : ● แอนติเจนหมู่เลือดเลวิส ● สารในน้ำลาย ● ผู้หลังสารเอบีเอช

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2561;28:407-14.

ได้รับต้นฉบับ 13 กันยายน 2561 แก้ไขบทความ 11 ตุลาคม 2561 รับลงตีพิมพ์ 5 พฤศจิกายน 2561

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ น.ส. กัลยา เกิดแก้วงาม ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

E-mail: kallayak@yahoo.com

Original Article

Lewis blood group antigens on red blood cells and in saliva of Thai blood donors

Phuraya Ovataga, Kallaya Kerdkaewngam, Sarika Mekchay, Jintana Tubrod and Pimol Chiewsilp

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: Lewis blood group antigens are highly diversity in expression as they are plasma antigens which are adsorbed onto red blood cells membrane and are also closely related with ABH secretor genes. Lewis phenotypes are very difficult to indicate due to cross-reactivity of commercially available monoclonal antisera. In blood donors who have Lewis gene, Lewis substances may also be found in their saliva. **Objective:** To test for the concordance between Lewis antigens on red blood cell and Lewis substances in saliva in Thai blood donors.

Materials and Methods: Blood and saliva samples for detection of Lewis antigens and Lewis substances from 206 blood donors during July 22 to Aug 26, 2016 were included in this study. The hemagglutination inhibition test and hemagglutination test were used for saliva and red blood cell testing, respectively. **Results:** ABH secretor status, Lewis phenotype and Lewis substances in saliva found were as follows: in secretor group, two phenotypes were found including Le (a-b+) and Le (a-b-). A total of 101 subjects were Le (a-b+) which secreted Le^a and Le^b substances in their saliva while 17 individuals possessed only Le^b substance. In addition, Lewis substance was not found in the saliva of 28 Le (a-b-) subjects. In ABH non-secretor group, two phenotypes including Le (a+b-) and Le (a-b-) were found. Le^a substance in saliva was found in 48 of Le (a+b-) phenotype while Lewis substance was not found in 8 subjects of Le (a-b-) phenotype. Furthermore, in the weak ABH secretor group, we found 4 cases of Le (a+b+) phenotype, which 3 subjects secreted Le^a and Le^b substances in saliva while the other one secreted only Le^a substance. Our results are consistent with the theory that; Le (a+b-) phenotype is ABH non-secretor, Le (a-b+) phenotype is ABH secretor, Le (a-b-) phenotype is ABH secretor or ABH non-secretor and Le (a+b+) phenotype is weak ABH secretor. **Conclusion:** Whenever Lewis phenotypes on red cells were inconclusive, the study of Lewis substances in saliva should be performed. In addition, some blood donors who have mismatched results, molecular method should be considered.

Keywords : ● Lewis blood group antigens ● Saliva substances ● ABH secretor

J Hematol Transfus Med. 2018;28:407-14.

บทนำ

แอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Lewis มีความหลากหลายในการแสดงออกอย่างมาก เพราะเป็นแอนติเจนของพลาสมา แล้วถูกเม็ดเลือดแดงดูดซับมาอยู่บนผิวเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง ไม่ได้เป็นโครงสร้างของเม็ดเลือดแดงเหมือนกับแอนติเจนหมู่เลือดระบบอื่นๆ อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องใกล้ชิดกับแอนติเจน ABH ของหมู่เลือดระบบ ABO เนื่องจากทำงานร่วมกับยีน secretor เหมือนกัน แอนติเจนหมู่เลือด Lewis เป็นสารอินทรีย์คาร์โบไฮเดรตและไขมัน ประเภท glycosphingolipids ของสารคัดหลั่ง (secreting substance) สามารถพบได้ทั้งในพลาสมา น้ำลาย และเนื้อเยื่ออื่นๆ ของร่างกาย ได้แก่ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เซลล์เม็ดเลือดเนื้อเยื่อตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ กล้ามเนื้อ ไต และเยื่อเมือก ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของหมู่เลือดระบบ Lewis มี 2 ยีน ได้แก่ ยีน Lewis (LE) หรือ FUT3 และยีน secretor (SE) หรือ FUT2 ทั้งสองยีนนี้สร้างเอนไซม์ fucosyltransferase ที่มีโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างกัน โดยยีน Lewis (LE) สร้าง α -1, 3/4-fucosyltransferase ส่วนยีน secretor (SE) สร้าง α -1,2-fucosyltransferase ยีน *le* และ *se* สร้างเอนไซม์ fucosyltransferase ที่ทำงานไม่ได้ และยีน *Se^w* สร้างเอนไซม์ fucosyltransferase ที่มีความแรงอ่อน แอนติเจนที่พบเป็นประจำของระบบ Lewis คือ Le^a และ Le^b เกิดเป็น phenotypes คือ $Le(a+b-)$ $Le(a-b+)$ และ $Le(a-b-)$ ส่วน phenotype ที่หายาก คือ $Le(a+b+)$ นอกจากนี้ระบบ Lewis ยังพบแอนติเจนอื่นๆ อีก คือ Le^c , Le^d , Le^x และ Le^y ซึ่งเป็นแอนติเจนหายาก¹⁻³

หมู่เลือด Lewis เกิดจากการทำงานของยีน 4 ชุด ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน ควบคุมการสร้างแอนติเจน A, B, H และ Lewis พบได้ในสารหลังต่างๆ ของร่างกาย ยีน 4 ชุด ได้แก่ ชุดที่หนึ่ง A, B, O ชุดที่สอง H, h ชุดที่สาม Se, se และชุดที่สี่ Le, le ยีน A, B, H, Se และ Le เป็นยีนเด่น จะควบคุมการสร้างเอนไซม์ glycosyltransferase ซึ่งไปนำน้ำตาลชนิดต่างๆ กันมาต่อเติมที่ส่วนปลายของโครงสร้างหลัก glycoprotein ซึ่งทำให้เกิด serologic specificity แตกต่างกัน ส่วนยีน O, h, se และ le เป็นยีนด้อยสร้างเอนไซม์ไม่ได้ แอนติเจน Le^b เป็นผลของการทำงานร่วมกันของยีน H และ Le สร้างเอนไซม์ glycosyltransferase นำน้ำตาล fucose ไปจับกับ N-acetylglucosamine ด้วย β 1, 4 linkage (Type II) ซึ่งจะเกิดได้ก็ต่อเมื่อ N-acetylglucosamine ต่อกับน้ำตาล galactose ด้วย chain ชนิด β 1, 3 linkage (Type I) เท่านั้น ดังนั้น ถ้าเป็นสาย Type II fucose ก็จะไม่จับ precursor จึงเปลี่ยนเป็น H determinant ไม่ได้ ส่วนแอนติเจน Le^a เกิดจากการไม่มียีน Se (*se/se*) หรือเป็น non-secretor ดังนั้น

Le^a precursor ก็จะไม่เปลี่ยนเป็นสาร H เมื่อไม่มีสาร H เกิดขึ้น จึงไม่มี substrate ไปทำให้เอนไซม์ซึ่งควบคุมยีน A, B และ O ทำงาน ดังนั้นในน้ำลายของคนที่เป็น non-secretor จึงมีแต่สาร Le^a อย่างเดียว สำหรับ phenotype $Le(a-b-)$ เกิดจากไม่มียีน *Le(le/le)* ถึงแม้ว่าจะมีหรือไม่มียีน Se ก็จะไม่มีแอนติเจน Lewis เกิดขึ้น³ และ phenotype $Le(a+b+)$ เกิดจากยีน *Se^w* คนที่มียีนนี้จะหลั่งสาร ABH ลดลง ทำให้เอนไซม์ glycosyltransferase สร้างสาร Le^b ได้น้อย จึงเหลือสาร Le^a อยู่ เป็นสาเหตุทำให้เกิด phenotype นี้⁵

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ เป็นผู้ผลิตเซลล์มาตรฐานที่ใช้ในงานตรวจกรองและตรวจแยกชนิดแอนติบอดีทั้งในผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยที่ต้องรับเลือดจึงมีความจำเป็นที่ต้องระบุ phenotype ที่ถูกต้องของโลหิตบริจาคที่จะนำมาใช้ผลิตเซลล์มาตรฐาน ซึ่งการระบุ phenotype ที่ถูกต้องของหมู่เลือดระบบ Lewis เป็นเรื่องยาก เนื่องจาก monoclonal antibodies ได้แก่ anti- Le^a และ anti- Le^b ที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน มักให้ปฏิกิริยา cross-reactivity ระหว่างแอนติเจน Le^a และ Le^b บ่อยครั้ง ทำให้ยากต่อการชี้บ่งในผู้บริจาคโลหิตบางรายว่ามี phenotype $Le(a+b-)$ หรือ $Le(a-b+)$ หรือเป็น rare phenotype $Le(a+b+)$ เนื่องจากแอนติเจนระบบ Lewis เป็นสารหลังที่พบในน้ำลายได้ด้วย³ ดังนั้นฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ จึงทำการศึกษาเพื่อตรวจ Lewis substances ในน้ำลายของผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธี hemagglutination inhibition test (HAI) เพื่อเปรียบเทียบความสอดคล้องกับการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี hemagglutination และเพื่อประเมินว่าการตรวจ Lewis substances ในน้ำลายควรทดสอบร่วมกับการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงในงานผลิตเซลล์มาตรฐานในผู้บริจาคโลหิตบางรายที่วิธีการตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงไม่สามารถระบุ phenotype ได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจแอนติเจน Lewis บนผิวเม็ดเลือดแดงและ Lewis substance ในน้ำลายผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วัสดุและวิธีการ

งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Certificate Number NBC 11/2016 เลขที่โครงการ 11/2559

การเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำลาย⁹

ตัวอย่างเลือดและน้ำลายจากผู้บริจาคโลหิตจำนวน 206 ราย ช่วงเวลาเก็บตัวอย่างระหว่างวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 ถึง

วันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2559 หลังจากทำการต้มน้ำลายในน้ำเดือด นำมาปั่นแยกเอาน้ำใสส่วนบนเก็บแช่แข็งที่ -30°C จนกระทั่งนำมาทดสอบ ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างชุดเดียวกันกับที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับ ABH secretor status ของผู้บริจาคโลหิตที่ได้รายงานไว้⁹

การตรวจหมู่เลือดระบบ Lewis บนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี standard tube technique

ตรวจหมู่เลือด Lewis บนผิวเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี standard tube technique ด้วย monoclonal anti-Le^a และ anti-Le^b จากสองแหล่งผลิตโดยใช้วิธีการตรวจตามเอกสารแนะนำวิธีการใช้ของผู้ผลิตแอนติบอดีนั้น ได้แก่ Anti-Le^a cell line LEA2 (CE-Immundiagnostika GmbH, Eschelbronn, Germany), Anti-Le^b cell line LEB2 (CE-Immundiagnostika GmbH, Eschelbronn, Germany), Epiclone anti-Le^a cell line 3C9 (CSL Limited, Melbourne, Australia), Epiclone anti-Le^b cell line LEB1 (CSL Limited, Melbourne, Australia)

การตรวจ Lewis substance ในน้ำลายด้วยวิธี HAI⁹⁻¹¹

ตรวจน้ำลายของผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธี HAI โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างน้ำลาย

เก็บตัวอย่างน้ำลายจากผู้บริจาคโลหิตมาแช่แข็งไว้ในกรณีที่ยังไม่ทำการทดสอบในวันที่เก็บตัวอย่าง เมื่อจะทำการทดสอบให้ละลายตัวอย่างน้ำลายปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร แช่หลอดทดลองในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อทำลายเอ็นไซม์ในน้ำลาย จากนั้นปั่น 3,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน ใส่หลอดทดลองสะอาด เจือจางน้ำลายด้วย normal saline solution (NSS) ในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -30°C จนกว่าจะถึงวันที่ทำการทดสอบ

2. การเจือจาง anti-Le^a และ anti-Le^b

เจือจาง anti-Le^a และ anti-Le^b ด้วยวิธี two-fold dilution แล้วทดสอบกับเซลล์ Le (a+b-) และ Le (a-b+) เลือก dilution ที่ให้ปฏิกิริยา agglutination 2+

3. การยับยั้งปฏิกิริยาของ anti-Le^a และ anti-Le^b ด้วย Le^a และ Le^b substances ในน้ำลาย

เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอด เขียนข้างหลอดว่า Le^a และ Le^b ใส่ในน้ำลายที่ต้องการจะตรวจหลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติม diluted anti-Le^a และ anti-Le^b ลงในหลอด Le^a และ anti-Le^b หลอดละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25-30^{\circ}\text{C}$) นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเติม 2% Le (a+b-) และ

Le (a-b+) cell suspension 50 ไมโครลิตร ลงในหลอด Le^a และหลอด Le^b หลอดละ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปั่นอ่าน 3,000 รอบ/นาที นาน 15 วินาที การแปลผลแปลตรงข้ามกับการทดสอบทาง serology ตามปกติคือ หลอดที่เกิดปฏิกิริยา agglutination แปลผลเป็นลบ คือในน้ำลายที่ทดสอบไม่มี Le^a และ Le^b substances ส่วนหลอดที่ไม่เกิดปฏิกิริยา agglutination แปลผลเป็นบวก คือในน้ำลายที่ทดสอบมี Le^a และ Le^b substances อยู่จึงไปยับยั้ง anti-Le^a และ anti-Le^b จึงไม่มี anti-Le^a และ anti-Le^b เหลือไปทำปฏิกิริยากับเซลล์

4. Positive และ negative controls ใช้ น้ำลายจากเจ้าหน้าที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติที่ทราบว่าเป็น secretor Le (a-b+) หรือ non-secretor Le (a+b-) มาทดสอบโดยใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ 3

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณความถี่ phenotype ของหมู่เลือด Lewis เป็นร้อยละ และคำนวณความถี่ยีน (gene frequency) ของยีน Le และ le โดยใช้สมการของ Hardy-Weinberg คือ $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ สำหรับยีนที่เป็น bi-allelic คือยีน Lewis (Le) และ Secretor (Se) โดย p และ q คือความถี่ของ allele และ $p + q = 1$

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ตรวจแอนติเจน Lewis บนผิวเม็ดเลือดแดงและตรวจหา Lewis substance ในน้ำลายผู้บริจาคโลหิตจำนวน 206 ราย พบว่า ผู้ที่หลังสาร ABH ในน้ำลาย (secretor) แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงมี 2 ลักษณะคือ Le (a-b+) และ Le (a-b-) โดยแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง Le (a-b+) ในน้ำลายพบสาร Le^a และ Le^b จำนวน 101 ราย และสาร Le^b ชนิดเดียวจำนวน 17 ราย ส่วนแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง Le (a-b-) ในน้ำลายไม่พบสาร Lewis 28 ราย ผู้ที่ไม่หลังสาร ABH (Non-secretor) แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงมี 2 ลักษณะเช่นกันคือ Le (a+b-) ซึ่งในน้ำลายพบสาร Le^a 28 ราย และ Le (a-b-) ไม่พบสาร Lewis ในน้ำลาย 8 ราย ตามลำดับ ผู้ที่หลังสาร ABH อ่อนๆ (weak secretor) แอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงเป็น Le (a+b+) และในน้ำลายพบสาร Le^a และ Le^b 3 ราย และพบสาร Le^a ชนิดเดียว 1 ราย (Table 1)

Phenotype frequency ของหมู่เลือด Lewis ที่พบมากที่สุดคือ Le (a-b+) 118 ราย ร้อยละ 57.28 รองลงมา คือ Le (a+b-) 48 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.30 และ Le (a-b-) 36 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.48 พบน้อยที่สุด คือ Le (a+b+) 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 1.94 ส่วน gene frequency ยีน Le เท่ากับ 0.5820 และยีน le เท่ากับ 0.4180 (Table 2)

Table 1 ABH secretor status, Lewis phenotypes and saliva Lewis substances in 206 donors

ABH secretor status	RBCs Lewis phenotypes		Saliva Lewis substances		Number
	Le ^a	Le ^b	Le ^a	Le ^b	
ABH Secretor	-	+	+	+	101
	-	-	-	+	17
	-	-	-	-	28
ABH Non-secretor	+	-	+	-	48
	-	-	-	-	8
ABH Secretor (weak)	+	+	+	+	3
	+	+	+	-	1

Table 2 Red cell phenotype and genotype frequencies of Lewis in 206 donors

Phenotype	Number	Phenotype Frequency (%)	Genotype alleles	Gene Frequency
Le (a+b-)	48	23.30	Le	0.582
Le (a-b+)	118	57.28		
Le (a+b+)	4	1.94		
Le (a-b-)	36	17.48	le	0.418

Table 3 Lewis phenotype and genotype frequencies compared with other studies

Type	Frequency			
	Present study	Chandanayingyong et.al. (1967)	Calderron et.al. (1984)	Kremastinou et.al. (1996)
Phenotype				
Le (a+b-)	23.30%	30.9%	16.66%	16-27%
Le (a-b+)	57.28%	51.4%	65.79%	71-83%
Le (a+b+)	1.94%	Not found	Not found	Not found
Le (a-b-)	17.48%	17.7%	17.54%	1-3%
Genotype				
Le	0.582	0.622	0.581	0.582
le	0.418	0.378	0.419	0.418

เมื่อเปรียบเทียบ phenotype frequency ของการศึกษานี้กับการศึกษาอื่นๆ ที่เคยรายงานไว้ phenotype Le (a+b-) การศึกษานี้พบร้อยละ 23.30 ต่ำกว่า Chandanayingyong และคณะที่พบร้อยละ 30.9 แต่สูงกว่า Calderon และคณะ ที่พบร้อยละ 16.66 แต่ในทางกลับกัน phenotype Le (a-b+) การศึกษานี้พบร้อยละ 57.28 ต่ำกว่า Calderon และคณะ ที่พบร้อยละ 65.79 แต่สูงกว่า Chandanayingyong และคณะ ที่พบร้อยละ 51.4 สำหรับ phenotype Le (a-b-) นั้น การศึกษาที่พบใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 17 และที่แตกต่างกันคือ การศึกษานี้พบ phenotype Le(a+b+) ร้อยละ 1.94 แต่ในรายงานอื่นๆ ที่ผ่านมามีไม่พบ phenotype ดังกล่าว (Table 3)

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบ Lewis gene frequency ของการศึกษานี้กับการศึกษาอื่นๆ การศึกษานี้พบยีน Le 0.582 ใกล้เคียงกับ Calderon และคณะ ที่พบ 0.581 แต่ต่างจาก Chandanayingyong และคณะ ที่พบสูงกว่าคือ 0.622 เช่นเดียวกัน ยีน le การศึกษานี้พบ 0.418 ใกล้เคียงกับ Calderon และคณะ ที่พบ 0.419 แต่ต่างจาก Chandanayingyong และคณะ ที่พบสูงกว่าคือ 0.378 (Table 3)

วิจารณ์

ผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้ (Table 1) สอดคล้องกับทฤษฎี คือ ผู้ที่มี phenotype บนเม็ดเลือดแดงเป็น Le (a+b-) จะไม่หลั่ง

สาร ABH (non-secretor) แต่มีสาร Le^a ในน้ำลายชนิดเดียว และผู้ที่มี phenotype บนมืดเลือดแดงเป็น Le (a-b+) จะหลังสาร ABH (secretor) ตามทฤษฎีแล้วผู้ที่ เป็น secretor สามารถตรวจพบทั้งสาร Le^a และ Le^b ในน้ำลาย ซึ่งในการศึกษานี้พบ 101 รายที่เม็ดเลือดแดงมี phenotype Le (a-b+) ที่พบทั้งสาร Le^a และ Le^b ในน้ำลาย อาจเนื่องมาจากสาร Le^a เปลี่ยนไปเป็นสาร H ไม่หมด อีก 17 ราย ไม่พบสาร Le^a ในน้ำลาย อาจเนื่องมาจากสาร Le^a เปลี่ยนไปเป็นสาร H จนหมด อีกทั้งแอนติเจน Lewis ที่พบในพลาสมานั้นไม่เหมือนกับในน้ำลาย โดยแอนติเจน Lewis ในพลาสมาเป็น pure carbohydrate มีน้ำตาลที่ตัวเกาะอยู่กับ polypeptide chain ส่วนแอนติเจน Lewis ในน้ำลายเป็น glycosphingolipids³ ผู้ที่มี phenotype บนมืดเลือดแดงเป็น Le (a-b-) พบได้ทั้งหลังสาร ABH (secretor) และไม่หลังสาร ABH (non-secretor) จะไม่พบสาร Lewis ในน้ำลายและ ผู้ที่มี phenotype บนมืดเลือดแดงเป็น Le (a+b+) เป็น weak ABH secretor² พบ phenotype Le (a+b+) 4 ราย ผลตรวจแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดงและสาร Le^a และ Le^b ในน้ำลายตรงกัน 3 ราย ส่วนอีก 1 รายตรวจไม่พบสาร Le^b ในน้ำลาย อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยา cross-reactivity ของ monoclonal antibodies หรือยารนี้สร้างสาร Le^b ได้น้อย ดังนั้นยารนี้ควรจะต้องทำการตรวจในระดับโมเลกุลเพิ่มเติม ผู้บริจาคโลหิตที่เป็น secretor และตรวจพบทั้งสาร Le^a และ Le^b ในน้ำลาย พบประมาณร้อยละ 10-40 ของประชากรชาวเอเชีย⁶ ผู้ที่มี phenotype Le(a-b-) และไม่พบสาร Lewis ในน้ำลาย แสดงว่า ผู้บริจาคโลหิตรายนั้นเป็น Le (a-b-) phenotype แต่ถ้าตรวจพบสาร Lewis ในน้ำลาย แสดงว่าผู้บริจาคโลหิตรายนั้นไม่ได้เป็น Le (a-b-) จริง ลักษณะเช่นนี้สามารถพบได้ในผู้หญิงตั้งครรภ์ ผู้ป่วยบางโรค เช่น โรคพิษสุราเรื้อรังที่มีภาวะตับแข็งและตับอ่อนอักเสบ ผู้ป่วยเนื้องอกและมะเร็ง⁷ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร Lewis ในพลาสมาปริมาณน้อย ทำให้เม็ดเลือดแดงไม่สามารถดูดซับมาอยู่บนผิวได้ จึงเห็นได้ว่าการบ่งชี้ว่าผู้บริจาคโลหิตคนใดเป็น Le (a-b-) phenotype ควรตรวจน้ำลายร่วมด้วยเพื่อเป็นการยืนยัน³ ดังนั้นในการนี้พบผู้บริจาคโลหิตที่ผลการตรวจ Lewis phenotype และสาร Lewis ในน้ำลายไม่สอดคล้องกัน ควรตรวจด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น ใช้วิธีการตรวจ DNA เพื่อตรวจยีนหมู่เลือด ซึ่งพบว่ามีวิธีการตรวจในระดับโมเลกุลอยู่ 2 วิธี ได้แก่ วิธีแรกโดย การตรวจยีน Fuc-TIII (*Le* gene) ด้วยวิธี PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งสามารถแยก Lewis (+) และ Lewis (-) ได้⁷ วิธีที่สองโดยการตรวจโครงสร้างโมเลกุลของแอนติเจน Lewis โดยตรงด้วยวิธี Proton Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่ง

เป็นวิธีการทางชีวเคมีฟิสิกส์ สามารถแยก Le (a+b-) และ Le (a-b+) ได้เช่นเดียวกัน⁸ แต่ทั้งสองวิธีมีความยุ่งยาก อีกทั้งต้องมีเครื่องมือเฉพาะไม่สามารถทำการตรวจได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

Phenotype frequencies ของหมู่เลือดระบบ Lewis ของงานวิจัยนี้แสดงใน Table 2 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ ใน Table 3 โดย Chandanayingyong et.al. (1967)¹² ศึกษาในคนไทย Calderon et.al. (1984)¹³ ศึกษาในชาวสเปน Kremastinou et.al. (1996)¹⁴ ศึกษาในชาวกรีซ จะเห็นว่างานวิจัยนี้กับ Chandanayingyong et.al. (1967) มีความถี่ของ Lewis phenotype ที่ใกล้เคียงกันเนื่องจากการศึกษาในคนไทยเหมือนกัน ต่างจากรายงานของ Calderon et.al. (1984) ที่เป็นการศึกษาในชาวสเปนนั้น พบ phenotype Le (a+b-) น้อยกว่าที่พบในคนไทย phenotype Le (a-b+) มากกว่าที่พบในคนไทย ส่วน phenotype Le (a-b-) นั้น ทั้งสามงานวิจัยพบเท่ากันคือ ประมาณร้อยละ 17 ต่างจากรายงานในชาวกรีซโดย Kremastinou et.al. (1996) phenotype Le (a-b-) เพียงร้อยละ 1-3 ซึ่งน้อยกว่ารายงานอื่นมาก งานวิจัยนี้แตกต่างจากงานวิจัยอื่นเนื่องจากพบ phenotype Le (a+b+) ด้วยร้อยละ 1.94 งานวิจัยที่ศึกษาในชาวสเปนและกรีซ ซึ่งเป็นคนผิวขาวไม่พบ phenotype นี้ เพราะไม่เคยมีรายงานว่าพบ phenotype Le (a+b+) ในคนผิวขาวมาก่อน ส่วนอีกงานวิจัยที่ทำในคนไทยเป็นคนละกลุ่มตัวอย่างกันไม่พบ phenotype Le (a+b+) อาจเนื่องมาจากบางครั้งสุ่มตัวอย่างแล้วไม่พบได้ เนื่องจาก phenotype Le (a+b+) หาได้ยาก ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรกในคนไทย แต่อีกสองรายงานไม่พบ phenotype ดังกล่าว รายงานอื่นๆ ในคนไทยพบ Le (a-b-) ประมาณร้อยละ 30³ งานวิจัยนี้พบ Le (a-b-) ต่ำกว่าที่พบในคนไทยบางรายงาน อาจเนื่องมาจากการสุ่มตัวอย่างของประชากรที่ใช้ศึกษา ซึ่งเป็นเรื่องปกติของการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ถึงแม้ว่าจะเป็นการศึกษาในคนเชื้อชาติเดียวกันก็ตาม เนื่องจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาเป็นคนละกลุ่มกัน และช่วงเวลาการศึกษาเป็นคนละช่วงเวลากัน แอนติเจนของหมู่เลือดอาจจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามช่วงเวลาได้ขึ้นอยู่กับว่าผู้ที่มีแอนติเจนนั้นๆ ได้ถ่ายทอดยีนของตนสู่ลูกหลานรุ่นต่อไปหรือไม่ ยีนบางยีนที่ไม่ได้ถ่ายทอดสู่ประชากรรุ่นต่อไปอาจจะหายไปได้ ในทางกลับกันยีนใดถูกถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อไปมากความถี่ของยีนนั้นจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ phenotype Le (a+b+) มีหลายรายงานที่พบ ได้แก่ ในชาวพื้นเมือง Polynesians ที่เกาะต่างๆ ของประเทศนิวซีแลนด์ โดย Henry et.al. (1990)¹¹ Henry et.al. (1988)¹⁵ พบ phenotype Le (a+b+) ร้อยละ 0-40 Broadberry et.al. (1991)¹⁶ และ Broadberry et.al. (1996)¹⁷ ได้ศึกษาในชาวจีนได้พบพบ phenotype Le (a+b+) ร้อยละ 25 และมีรายงาน

ในชาวอเมริกันทั้งผิวขาวและผิวดำ โดย Molthan ทำการศึกษาในผู้ใหญ่และเด็กทารก ในผู้ใหญ่อเมริกันผิวขาวและผิวดำไม่พบ phenotype (a+b+) แต่พบในทารกผิวขาวร้อยละ 37.4 และในทารกผิวดำร้อยละ 13.2¹⁸ รายงานในชาวบังคลาเทศ ที่เมืองหลวงธากา พบ phenotype Le (a+b+) ร้อยละ 2.0¹⁹ รายงานในคนผิวขาวชาวยุโรปพบ phenotype Le (a-b+) สูงที่สุด รองลงมาคือ phenotype Le (a+b-) และ Le (a-b-) คนผิวดำพบ phenotype Le (a-b+) สูงที่สุด รองลงมา คือ phenotype Le (a+b-) และ Le (a-b-)⁵ เช่นเดียวกัน แต่บางรายงานพบ phenotype Le (a-b-) ในคนอเมริกันผิวดำเกือบร้อยละ 30 คนแอฟริกันผิวดำพบสูงถึงร้อยละ 40² จากรายงานทั้งหมดที่นำมาเปรียบเทียบข้างต้น จะเห็นได้ว่าคนผิวขาว phenotype Le (a-b-) น้อยกว่าในคนผิวเหลืองและผิวดำ และไม่พบ phenotype Le (a+b+) ในผู้ใหญ่ทั้งผิวขาวและผิวดำ แต่พบ phenotype Le (a+b+) ได้เป็นจำนวนมากในคนผิวเหลือง

ในการศึกษาที่พบ gene frequency ของยีน Lewis alleles *Le* และ *le* ใกล้เคียงกับ Chandanayingyong et.al. (1967) และ Calderon et.al. (1984) จะเห็นว่า gene frequency ของทั้งสามงานวิจัยใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าจะมี phenotype Le (a+b-) และ phenotype Le (a-b+) ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากแสดงออกของแอนติเจน *Le^a* และ *Le^b* ต้องอาศัยยีน secretor (*Se*) ร่วมด้วย (Table 3)

ปัจจุบันหมู่เลือดระบบ Lewis อาจถูกระบุว่ามีความสำคัญทางคลินิกน้อยในกลุ่มประชากรผิวขาว เนื่องจากแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบนี้ เช่น anti-*Le^a* anti-*Le^b* และ anti-*Le^a + anti-*Le^b** ส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีชนิด IgM เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำ (4-22 °C) บางครั้งไม่เกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิร่างกาย จึงไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือด (transfusion reaction) อย่างไรก็ตาม แอนติบอดีของหมู่เลือดระบบนี้ สามารถร่วมกับ complement ทำให้เกิด hemolysis ได้เช่นเดียวกับกับระบบ ABO แต่พบได้น้อย อาจจะเนื่องมาจากแอนติบอดีส่วนใหญ่มีความแรงต่ำกว่า anti-A และ anti-B อีกทั้งเกิดปฏิกิริยาแรงกับเฉพาะเลือดหมู่ O เท่านั้น เพราะหมู่ O ไม่มีแอนติเจน A และ B ส่วนหมู่เลือด A, B และ AB จะเกิดปฏิกิริยาได้ไม่แรง แอนติบอดีในระบบ Lewis ที่มีความสำคัญทางคลินิกต้องเป็นแอนติบอดีชนิด IgG และสามารถเกิดปฏิกิริยาร่วมกับ complement ที่อุณหภูมิร่างกาย ซึ่งแอนติบอดีชนิด IgG พบได้ไม่บ่อย โดยรวมจึงถือว่าแอนติบอดีในระบบ Lewis เป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกน้อย²⁰ แอนติบอดีในระบบ Lewis มักจะเป็นแอนติบอดีที่เกิดขึ้นเอง (natural occurring) ส่วนใหญ่พบในคนที่มี phenotype Le

(a-b-) ในตัวอย่างเลือดที่โรงพยาบาลส่งตรวจแอนติบอดี ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รายงานโดย Kupatawintu, et.al.²¹ พบแอนติบอดีระบบ Rh มากที่สุด ร้อยละ 42.2 รองลงมาคือ แอนติบอดีระบบ MNS, Kidd และ Lewis ร้อยละ 31.9, 10.5 และ 5.9 ตามลำดับ และเป็นแอนติบอดีระบบอื่นๆ อีก ร้อยละ 9.5 จากการศึกษาแอนติบอดีในหญิงตั้งครรภ์ที่โรงพยาบาลรามธิบดีจำนวน 2,500 ราย พบแอนติบอดีในระบบ Lewis สูงถึงร้อยละ 78.8²² ส่วนการศึกษาในประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ²³ พบแอนติบอดีในระบบ Lewis สูงถึงร้อยละ 54.31 ดังนั้นในงานตรวจกรองแอนติบอดีของผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยที่ต้องรับเลือดจึงมีความจำเป็นที่ต้องตรวจกรองแอนติบอดีชนิดนี้เพื่อการจัดหาเลือดที่เหมาะสม

สรุป

เมื่อผลการตรวจ Lewis phenotype จากเม็ดเลือดแดงไม่สามารถแปลผลได้ชัดเจน ควรตรวจ Lewis substance ในน้ำลายสำหรับผู้บริจาคโลหิตบางรายที่ได้ผลจากทั้งสองวิธีไม่สอดคล้องกัน ควรใช้วิธีการตรวจในระดับโมเลกุลเพิ่มเติม ได้แก่ การตรวจยีน *Fuc-TIII (Le gene)* ด้วยวิธี PCR-RFLP หรือการตรวจโครงสร้างโมเลกุลของแอนติเจน Lewis ด้วยวิธี Proton Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

เอกสารอ้างอิง

1. Henry S, Gilliver L. Review: Biochemistry of carbohydrate blood group antigens. *Immunohematology*. 2003;19:33-42.
2. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang*. 1995;69:166-82.
3. Chandanayingyong D. Lewis blood group system. In: *Transfusion Medicine*. Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand. 1998:85-90.
4. Kerdkaewmgam K, Tubrod J. The differences of nine blood groups system in the three major ethnicities of human. *J Med Tech Assoc Thailand*. 2015;43:5127-40.
5. Harmening DM. The Lewis system. In: *Modern blood banking and transfusion practices*. 4th ed. Baltimore: FA Davis Company. 1999:145-60.
6. Combs MR. Lewis blood group system review. *Immunohematology*. 2009;25:112-8.
7. Yazawa S, Oh-kawara H, Nakajima T, Hosomi O, Akamutsu S, Kishi K. Histo-blood group Lewis genotyping from human hairs and blood. *Jpn J Human Genet*. 1996;41:177-88.
8. Dabrowski J, Hanfland P, Egge H, Dabrowski U. Immunohistochemistry of the Lewis blood group system: Proton nuclear magnetic resonance study of plasmatic Lewis blood group active glycosphingolipids and related substances. *Arch Biochem Biophys*. 1981;210:405-11.

9. Kong SP, Chiewsilp P, Tubrod J, Deesin P. ABH secretor status in the Thai population. *J Hematol Transfus Med.* 2016;26:199-205.
10. Combs MR. Method Section 2-8 Testing saliva for A, B, H, Le^a, and Le^b antigens section 2 red cell typing. In: Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hillyer CD, eds. *Technical manual* 16th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks. 2008:883-5.
11. Henry SM, Benny AG, Woodfield DG. Investigation of Lewis phenotype in polynesians: evidence of a weak secretor phenotype. *Vox Sang.* 1990;58:61-6.
12. Chandanayingyong D, Sasaki TT, Greenwalt TJ. Blood group of the Thais. *Transfusion.* 1967;7:269-76.
13. Calderon RF, Campillo FM, Escudero MC, Gallardo L. Lewis phenotype and secretor character in the "Castilla la Nueva" -region (Spain). ABH and Lewis antigen level in salivary secretion. *Anthrop. Anz.* 1984;42:31-9.
14. Kremastinou J, Tzanakaki G, Karafoti PH, Elton RA, Weir DM, Blackwell CC. Distribution of ABO and Lewis blood groups in Greece. *Gene Geogr.* 1996;10:201-5.
15. Herry SM, Simpson LA, Woodfield DG. The Le(a+b+) phenotype in Polynesians. *Hum Hered.* 1988;38:111-6.
16. Broadberry RE, Lin-Chu M. The Lewis blood group system among Chinese in Taiwan. *Hum Hered.* 1991;41:290-4.
17. Broadberry RE, Lin-Chu M. Comparison of the Lewis phenotypes among the different population groups of Taiwan. *Transfus Med.* 1996;6:255-60.
18. Mothan L. Lewis phenotypes of American caucasians, American negroes and their children. *Vox Sang.* 1980;39:327-30.
19. Akhter S, Kibria GM, Akhter NR, Habibullah MM, Islam SMK, Zakariah M. ABO and Lewis blood grouping with ABH secretor and non-secretor status: A cross sectional in Dhaka. *Faridpur Med Coll J.* 2011;6:38-40.
20. Mollison PL. The Lewis system. In: *Blood transfusion in clinical medicine.* 10th ed. Victoria: Blackwell Science Ltd; 1997:132-8.
21. Kupatawintu P, Emtip M, Sungnoon D, Ovataga P, Manakul V, Limtamaporn S, Tubrod J. Unexpected antibodies of patient' blood samples sent for testing at NBC. TRCS. *J Hematol Transfus Med.* 2010;20:255-62.
22. Ratanasirivannich P, Chiewsilp P. Red cell antibody pattern in Thai pregnant women. *Thai J Hematol Med.* 1996;6:131-3.
23. Romphruk A, Urwijitaroon Y, Puapairoj C, Akkahart C, Pachoat L, Pattayaso P. Unexpected antibodies in northeastern-Thai. *Thai J Hematol Transf Med.* 1994;4:135-40.