

นิพนธ์ต้นฉบับ

The B_{weak} Phenotype in a Thai Family

เรืองรอง ชีพสัตยากร, รัตดา ฟองสัถยกุล*, อมรรัตน์ ร่มพฤษ***, ธาณินทร์ ภูพัฒน์**,

Heinrich F. Steger**, ชาญวิทย์ ลีลายวัฒน์**** และ สุชีลา ชมสุข*

ภาควิชาพยาธิวิทยา, *ธนาคารเลือด, **ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์, *ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ: รายงานหมู่เลือด B_{weak} จำนวน 2 ราย เป็นชายไทยซึ่งเป็นผู้บริจาคโลหิตที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และบิดา การตรวจหมู่เลือดขั้นต้นด้วยวิธี slide test พบว่าเป็นหมู่ O โดยให้ผลลบกับ anti-A, anti-B และ anti-A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) แต่ผลการตรวจหมู่เลือดด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลองและด้วยวิธี เจลพบว่า cell grouping ให้ผล 2+ และมีลักษณะ mixed-field agglutination (mf) กับ anti-B และ anti-A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) แต่ให้ผลลบกับ anti-B (DiaMed) และ anti-B (Bioscot) และให้ผลลบกับ anti-A พบ weak anti-B ในซีรัมซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของตัวเอง การตรวจ antibody screening และ direct antiglobulin test ให้ผลลบ การศึกษาน้ำลายพบ H substance โดยไม่พบ B substance การตรวจหาลักษณะทางพันธุกรรมของ ABO alleles และ nucleotide sequence จากตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคและบิดา ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) ที่ exon 6, 7 และ intron 6, polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ที่ exon 6, 7 และ DNA sequencing บริเวณ nucleotide ตำแหน่งที่ 810-1,065 ของ exon 7 พบว่าผู้บริจาคและบิดาเป็น heterozygous แบบ B, O¹ การศึกษาหมู่เลือดในครอบครัว บิดามี B_{weak} phenotype เช่นเดียวกับผู้บริจาค มารดาและน้องชายมีหมู่เลือด A₁ พบ A¹(C467T), O¹ allele ลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่เลือด B_{weak} จากรายงานครั้งนี้แตกต่างจากหมู่เลือด B_{weak} ที่เคยมีรายงานในต่างประเทศซึ่งพบว่ามี B^{weak} allele ซึ่งเกิดจาก point mutation ที่ตำแหน่ง T863G, G871A, C873G, A1036G, G1055A หรือ B³ allele ซึ่งเกิดจาก C1054T ที่ exon 7 ผู้บริจาคและบิดาอาจมี B^{weak} allele ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของยีนที่ตำแหน่งอื่นซึ่งไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีการที่กล่าวข้างต้น ผู้บริจาคและบิดาไม่มีประวัติการเจ็บป่วยร้ายแรงและไม่เคยรับเลือดมาก่อน ได้ติดตามผู้บริจาคมาตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี serology ซ้ำในเวลา 1 ปีถัดมา พบว่าผู้บริจาคมี B_{weak} phenotype เหมือนเดิม คนหมู่เลือด B_{weak} อาจทำให้เกิดปัญหาในการให้เลือดเนื่องจากวินิจฉัยผิดเป็นหมู่เลือด O การนำเม็ดเลือดแดง B_{weak} ไปให้คนหมู่เลือด O อาจทำให้เกิด transfusion reaction ดังนั้นการตรวจหมู่เลือดอย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญในทางคลินิก

Key Words : ● B_{weak} phenotype ● B allele ● PCR-SSP ● DNA sequencing

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2545;12:77-90.

ได้รับต้นฉบับ 3 กุมภาพันธ์ 2545 และให้ตีพิมพ์ 12 กุมภาพันธ์ 2545

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ แพทย์หญิงเรืองรอง ชีพสัตยากร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ถนนอินทวโรรส ต.ศรีภูมิ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

หมู่เลือด ABO เป็นหมู่เลือดระบบแรกที่พบในปี พ.ศ. 2443 (ค.ศ. 1900) โดย Karl Landsteiner และเป็นหมู่เลือดที่มีความสำคัญมากที่สุดในด้านการให้เลือด แอนติเจนของระบบ ABO พบได้บนผิวเม็ดเลือดแดง และเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย แอนติบอดีของระบบ ABO เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (naturally occurring antibodies) โดยไม่จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงมาก่อนเช่น การได้รับโลหิตหรือการตั้งครรภ์¹ คนเราจะมี anti-A หรือ anti-B ขึ้นกับว่าคนนั้นไม่มีแอนติเจนอะไร เช่น คนหมู่เลือด A ไม่มีแอนติเจน B จึงมี anti-B ทำนองเดียวกันคนหมู่เลือด B มี anti-A คนหมู่เลือด O มี anti-A และ anti-B และคนหมู่เลือด AB ไม่มี anti-A และ anti-B หมู่เลือดระบบ ABO ยังสามารถแบ่งได้เป็น subgroup ชนิดต่างๆ ตามคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาของเม็ดเลือดแดงกับแอนติซีรัมมาตรฐาน การพบแอนติบอดีในซีรัม และการหลั่งสาร A, B และ H ในน้ำลาย^{1,2} คนหมู่เลือด A ส่วนใหญ่ (80%) เป็นหมู่เลือด A₁ ที่เหลือเป็นหมู่เลือด A₂ คนหมู่เลือด A₂ มีแอนติเจน A น้อยกว่าคนหมู่เลือด A₁ (ประมาณ 25% ของคนหมู่เลือด A₁) ประมาณ 1-8% ของคนหมู่เลือด A₂ และ 22-35% ของคนหมู่เลือด A₂B สามารถตรวจพบ anti-A₁ ในซีรัม หมู่เลือด subgroup A ที่อ่อนกว่าหมู่เลือด A₂ ได้แก่หมู่เลือด A₃, A_x, A_m และ A_{el} ซึ่งสามารถพบได้แต่น้อยกว่าหมู่เลือด A₂⁴

คนหมู่เลือด subgroup B พบน้อยกว่า subgroup A การจำแนก subgroup B ชนิดต่างๆ ขึ้นกับการทำปฏิกิริยาของเม็ดเลือดแดงกับ anti-B และ anti-A,B การตรวจพบ weak anti-B ในซีรัม และการหลั่ง B และ H substance ในน้ำลาย หมู่เลือด subgroup B สามารถแบ่งได้เป็นหมู่เลือด B₃, B_x, B_m และ B_{el}^{1,10} ในคนหมู่เลือด B₃ การทำปฏิกิริยาของเม็ดเลือดแดงให้ผล 2+ และมีลักษณะ mixed-field agglutination (mf) กับ anti-B และ anti-A,B ไม่พบ weak anti-B ในซีรัม

แต่พบ B และ H substance ในน้ำลายถ้าเป็น secretor คนหมู่เลือด B_x การทำปฏิกิริยาของเม็ดเลือดแดงให้ผล 1+ กับ anti-B และ anti-A,B พบ weak anti-B ในซีรัม และพบ H substance โดยไม่พบ B substance ในน้ำลาย คนหมู่เลือด B_m เม็ดเลือดแดงไม่ทำปฏิกิริยากับ anti-B และ anti-A,B ไม่พบ weak anti-B ในซีรัม แต่พบ B และ H substance ในน้ำลาย คนหมู่เลือด B_{el} เม็ดเลือดแดงไม่ทำปฏิกิริยากับ anti-B และ anti-A,B พบ weak anti-B ในซีรัม พบ H substance โดยไม่พบ B substance ในน้ำลาย แอนติเจน B บนเม็ดเลือดแดงในคนหมู่เลือด B_{el} และ B_m สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี adsorption and elution การจำแนก subgroup B ด้วยวิธีการตรวจทาง serology ดังได้กล่าวข้างต้นขึ้นกับแอนติซีรัมมาตรฐานที่ใช้เม็ดเลือดแดงของคน subgroup B เมื่อทำปฏิกิริยากับ monoclonal anti-B ซึ่งมีความจำเพาะ ความแรง และความสามารถในการตรวจเซลล์ weak B antigen ที่ไม่เท่ากัน อาจให้ปฏิกิริยาแตกต่างกัน การจำแนกหมู่เลือด B₃ และ B_{el} ก่อนข้างต้นชัด แต่หมู่เลือด B_x บางครั้งการตรวจทาง serology อาจให้ปฏิกิริยาที่ไม่ชัดเจน ปัจจุบันจึงเรียก subgroup B ที่มีปฏิกิริยาไม่ชัดเจนนี้ว่า B_{weak}¹¹

ในบางกรณีเช่น ตัวอย่างเลือดมีน้อย หรือคนที่เป็น nonsecretor การตรวจทาง serology อาจทำได้ไม่สมบูรณ์หรือทำไม่ได้ การตรวจดีเอ็นเอเพื่อหา ABO allele ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP), polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และการตรวจหา nucleotide sequence อาจช่วยแก้ปัญหาได้¹²⁻¹⁸ หมู่เลือด subgroup A และ subgroup B ทำให้เกิดปัญหาในผู้บริจาคโลหิต เนื่องจากแอนติเจน A และแอนติเจน B ของ subgroup A และ subgroup B อ่อนกว่าแอนติเจน A และแอนติเจน B ของคนปกติ ทำให้บางครั้งไม่สามารถเห็นปฏิกิริยาจากการตรวจหมู่เลือดขั้นต้นด้วยวิธี slide

test และถ้าไม่ได้รับการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธีมาตรฐาน ในหลอดทดลองอาจทำให้วินิจฉัยผิดเป็นหมู่ O คน subgroup B พบได้ค่อนข้างน้อย มีรายงานหมู่เลือด B₃ ประปราย^{5,19-21} ส่วน B_x หรือ B_{weak} พบได้น้อยมาก^{4,18} และรายนี้พบเป็นรายแรกในผู้บริจาคโลหิตของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ จึงรวบรวมข้อมูลนำเสนอเป็นรายงาน

รายงานหมู่เลือด B_{weak}

ชายไทย อายุ 21 ปี เป็นผู้บริจาคโลหิตที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ 1 ปีก่อนการบริจาคครั้งนี้ ได้ไปบริจาคโลหิตที่โรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดภาคเหนือจำนวน 2 ครั้ง และผลการตรวจหมู่เลือดที่โรงพยาบาลแห่งนั้นพบเป็นหมู่เลือด O ผู้บริจาคไม่มีประวัติการเจ็บป่วยร้ายแรงและไม่เคยรับเลือดมาก่อน การตรวจหมู่เลือดขั้นต้นด้วยวิธี slide test ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่พบว่า เป็นหมู่เลือด O โดยให้ผลลบกับ anti-A, anti-B และ anti-A,B monoclonal (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) แต่ผลการตรวจหมู่เลือดด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลองพบว่า เป็นหมู่ B ทำให้สงสัยเป็น subgroup B จึงได้ติดตามผู้บริจาคและครอบครัวมาตรวจหมู่เลือดเพื่อศึกษาเพิ่มเติม

วัสดุและวิธีการ

การตรวจทาง serology

นำ clotted blood มาตรวจ ABO, H,Rh (D), Lewis ด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลอง^{22,23} โดยใช้ anti-A, anti-A₁, anti-A,B, anti-D, anti-H monoclonal (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย), anti-B monoclonal (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย, DiaMed, Bioscot) และ anti- Le^a, anti- Le^b monoclonal (DiaMed) นำเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคมาทำ ABO grouping ด้วยวิธีเจลโดยใช้ neutral gel card (DiaMed) และ anti-A, anti-B, anti-A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) ตรวจ antibody

screening ในซีรัม²⁴ direct antiglobulin test (DAT) บนเม็ดเลือดแดง²⁵ ทำ autocontrol โดยนำเม็ดเลือดแดงของผู้ถูกทดสอบมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ให้นอง นำซีรัมของผู้บริจาคและบิดามาทำปฏิกิริยากับ B cell ของคนปกติ 10 คน ตรวจแอนติเจน B บนเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคและบิดาด้วยวิธี adsorption and elution²⁶ ตรวจหา A, B และ H substance ในน้ำลาย²⁷

การตรวจดีเอ็นเอ

Polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

วิธีที่ 1. การตรวจ O allele

สกัดดีเอ็นเอจาก ACD blood ด้วยวิธี simple salting out²⁸ reaction mixture 10 µL ประกอบด้วยน้ำสกัดดีเอ็นเอ 10 ng, primer (261X : 5'- GTGGAA GGATGTCCTCGTGGTAC- 3' และ 261C : 5'- AATGTCCACAGTCACTCGCCACT-3')²⁹ 1 µM, dNTPs 0.2 mM, Taq polymerase 0.4 unit และ reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% BSA, 0.05% Tween-20) PCR amplification โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังนี้ 94 °C 1 นาที, 66 °C 30 วินาที และ 72 °C 30 วินาที จำนวน 35 รอบ ตรวจ PCR product โดยการทำ electrophoresis ใน 2% agarose gel ตรวจหาแถบดีเอ็นเอขนาด 195 คู่เบส โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder positive control คือตัวอย่างดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด O และ negative control คือตัวอย่างดีเอ็นเอของคนหมู่เลือด AB

วิธีที่ 2. การตรวจ ABO alleles^{17,18}

ทำ multiplex PCR 3 reaction โดยผสม primer (W1, W2, W3) ดังตารางที่ 1 reaction mixture 10 µL ประกอบด้วยน้ำสกัดดีเอ็นเอ 100 ng, each primer 2 pmol, dNTPs 2 nmol, AmpliTag Gold 0.5 unit และ buffer เริ่มด้วย denaturation 96 °C 10 นาที ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบๆ

ตารางที่ 1 Primers used to screen for ABO gene mutations by PCR-SSP or PCR-RFLP

Primer designation	Reaction ID	Primer sequence (5'→3')	Primer location in ABO gene
PCR-SSP			
JK-F3	W1	CATGCTGCCATAGGATCATTGC	*
JK-R3	W1	GAGCCAGGAGGTGGGTTTGC	*
ABO-in3F	W1	GCTGGCCGTTACAGGGTCTG	Intron 3
ABO-203CR	W1	AGGGAGGCACTGACATTATACG	Exon 4
mo-57a	W1	GGGTTTGTTCCTATCTCTTTGC	Intron 5
ABO-350CR	W1	CTTGATGGCAAACACAGTTAACG	Exon 6
mo-101s	W2-3	CCGTCCGCCTGCCTTGCA	Intron 6
ABO-407R-Aw	W2	CCATGAAGTGCTTCTCCGCCA	Exon 7
ABO-965R-Aw	W2	GCTGCTGGTCCCACAAGTACC	Exon 7
ABO-996R-Aw	W2	TCCTCAGGACGGCGGGTC	Exon 7
ABO-539R-Bw	W3	CATGGACACGTCTTGCCAGT	Exon 7
ABO-548R-Bw	W3	ATGCGGCGCATGGACACGC	Exon 7
ABO-721R-ABw	W3	CTCGTAGGTGAAGGCCTCCCA	Exon 7
ABO-863R-Bw	W3	GTTGGCCTGGTCGACCATCC	Exon 7
ABO-873R-Bw	W3	CTCGATGCCGTTGGCCTGC	Exon 7
ABO-1036R-Bw	W3	CGGACCGCCTGGTGGTTCC	Exon 7
ABO-1055R-Bw	W3	GCAGCCGCTCACGGGTTCT	Exon 7
PCR-RFLP			
mo-46	R1	CGGAATTCACTCGCCACTGCCTGGGTCTC	Exon 6
mo-57	R1	CGGGATCCATGTGGGTGGCACCCGTGCCA	Exon 6
mo-101	R1	CGGGATCCCCGTCCGCCTGCCTTGCA	Exon 7
mo-71	R1	GGGCCTAGGCTTCAGTTACTC	Exon 7
mo-41	R2	TAAATCCTGCTCCTAGACTAAAC	Exon 4
mo-42	R2	GGACAATTCTGTGACATGGGAG	Exon 4
fy-47	R2	TGCTGGAGGTGCGCGCCTAC	Exon 7
fy-31	R2	GAAATCGCCCTCGTCCTT	Exon 7

* These primer sequences correspond to exon 8 and 9 sequences in the JK blood group gene.

ดังนี้ 94°C 20 วินาที 65°C 30 วินาที และ 72°C 40 วินาที จำนวน 30 รอบ (W1) หรือ 94°C 30 วินาที 65°C 30 วินาที และ 72°C 90 วินาที จำนวน 32 รอบ (W2, W3) ตรวจ PCR product จากการทำ electrophoresis ใน 2% agarose gel

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)^{15,16}

ทำ multiplex PCR 2 reaction โดยผสม primer (R1,R2) ดังตารางที่ 1 reaction mixture 10 µL ประกอบด้วยน้ำสกัดดีเอ็นเอ 100 ng, each primer 2 pmol, dNTPs 2 nmol, Taq polymerase 0.5 unit และ buffer เริ่มด้วย denaturation 94°C 2 นาที ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบๆ ดังนี้ denaturation 94°C 10 วินาที annealing และ extension 65°C 60 วินาที จำนวน 10 รอบ และ denaturation 94°C 10 วินาที annealing 61°C 50 วินาที และ extension 72°C 20 วินาที จำนวน 20 รอบ นำ PCR product มาย่อยด้วย *HpaII*, *KpnI*, *MboI*, *DdeI*, *Sall* ที่ 37°C และ *BstUI* ที่ 60°C 2 ชั่วโมง ตรวจ cleavage product จาก electrophoresis ใน 4% agarose gel

DNA sequencing

PCR amplification B gene ของผู้บริจาคและบิดา โดยใช้ primer (position 803 : 5'- GATTTCTAC TACATGGGGGC -3' และ position 1191 : 5'- GTGTGATTGAGGTGGGGAC -3') ตรวจ PCR product โดยการทำ electrophoresis ใน agarose gel มองหาแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส ที่เรืองแสง ultraviolet และตัดแถบดีเอ็นเอจาก agarose gel นำมา purify ด้วย QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Germany) เตรียม sequencing reaction 20 µL โดยใช้ purify DNA 400 ng, primer 3.2 pmol และ dRhodamine terminator cycle sequencing kit with AmpliTaq DNA polymerase

(Perkin Elmer, USA) ทำตาม manufacturer's instruction และใช้ primer position 803 เป็น forward sequencing primer และ primer position 1191 เป็น reverse sequencing primer ตรวจหา nucleotide sequence ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic analyzer (Perkin Elmer, USA)

ผลการศึกษา

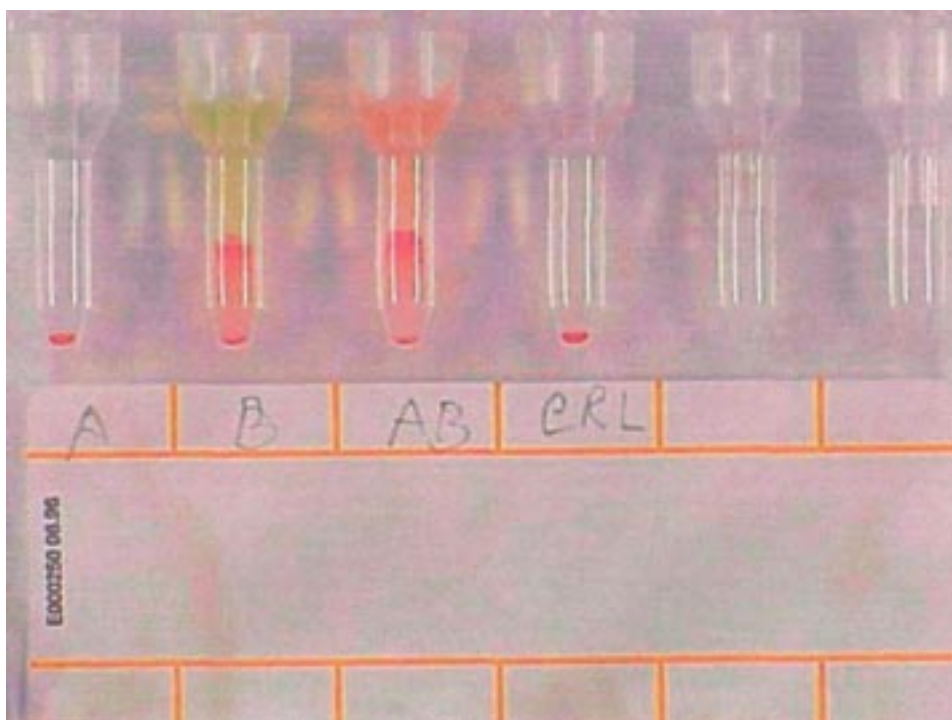
การตรวจหมู่เลือด ABO ของผู้บริจาคแสดงไว้ใน ตารางที่ 2 การตรวจ cell grouping ด้วยวิธีมาตรฐาน ในหลอดทดลองพบว่าเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคให้ผล 2+ และมีลักษณะ mf กับ anti-B และ anti- A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) แต่ให้ผลลบกับ anti-B (DiaMed) และ anti-B (Bioscot) และให้ผลลบกับ anti-A และ anti-A₁ แสดงว่าผู้บริจาคน่าจะหมู่เลือด B อย่างอ่อน ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับ anti-B (Dia Med) และ anti-B (Bioscot) การตรวจ cell grouping ด้วยวิธีเจลพบว่าให้ผล 2+ และมีลักษณะ mf กับ anti-B และ anti- A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย) ดังแสดงในรูปที่ 1 การแปลผลปฏิกิริยา mf เปรียบเทียบกับ A₃ control cell จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย การตรวจ serum grouping พบว่าซีรัมของผู้บริจาคให้ผล 4+ กับ A₁ cell แต่ให้ผลบวกอย่างอ่อน (weak positive) กับ B cell ปกติ (2 ใน 10 ราย) การตรวจ antibody screening ในซีรัม และ DAT ให้ผลลบ แสดงว่าผู้บริจาคมีหมู่เลือด B อย่างอ่อนและมี weak anti-B ในซีรัม จึงนำเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคมาทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้บริจาคเอง (autocontrol) พบว่าให้ผลลบ แสดงว่า weak anti-B ในซีรัมไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของตัวเอง และการตรวจหาแอนติเจน B บนเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคด้วยวิธี adsorption and elution พบว่าให้ผลบวก การตรวจหมู่เลือด H, Rh (D) และ Lewis พบว่าผู้บริจาคมีหมู่เลือด H, RhD positive และ Le (a- b+) การมีหมู่

ตารางที่ 2 ABO grouping and saliva testing in the family study

Family	Cell grouping*					Serum grouping*			Sub-stance in saliva
	Anti-A ₁	Anti-B (Thai Red Cross)	Anti-B (Bioscot)	Anti-B (DiaMed)	Anti-A,B	A ₁ cell	B cell	O cell	
Donor	neg	2+, mf	neg	neg	2+, mf	4+	weak (2/10)	neg	H
Father	neg	2+, mf	1+, mf	neg	2+, mf	4+	1+ (7/10)	neg	H
Mother	3+	neg	ND	ND	4+	neg	4+	neg	A&H
Brother	3+	neg	ND	ND	4+	neg	4+	neg	A&H

mf = mixed - field agglutination; neg = negative; ND = not done

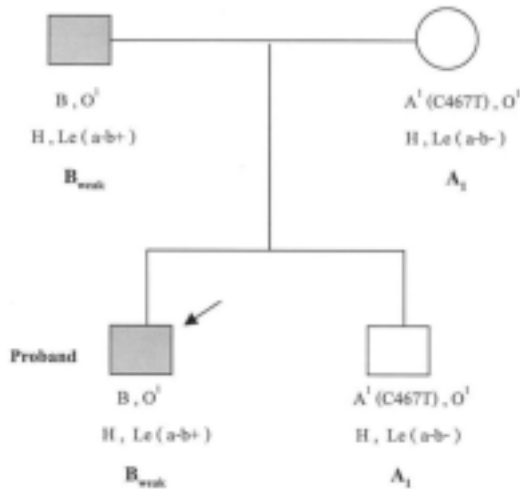
* Tube tests for determination of ABO type of red cells and serum



crl = control negative

รูปที่ 1 The ABO grouping of the donor using neutral gel card and anti-A, anti-B, anti-A,B (Thai Red Cross)

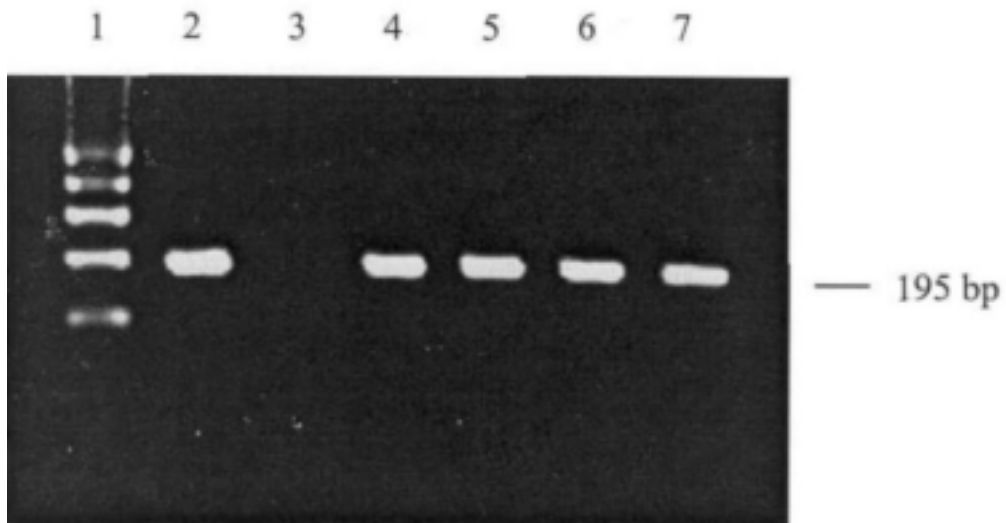
เลือด Le^b แสดงว่าผู้บริจาคน่าจะเป็น secretor จึงได้เก็บ
น้ำลายผู้บริจาคเพื่อตรวจหา B และ H substance ผล
การตรวจพบ H substance โดยไม่พบ B substance
ในน้ำลาย แสดงว่าผู้บริจาคมีหมู่เลือด B_{weak}



รูปที่ 2 The ABH and Lewis phenotypes and ABO genotypes of the family members

การศึกษาหมู่เลือดของครอบครัวนี้แสดงไว้ในตาราง
ที่ 2 บิดามีหมู่เลือด B_{weak} เช่นเดียวกับผู้บริจาค โดยเม็ด
เลือดแดงของบิดาให้ผล 2+ และมีลักษณะ mf กับ anti-
B และ anti-A,B (ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาด
ไทย) ให้ผล 1+ และมีลักษณะ mf กับ anti-B (Bioscot)
แต่ให้ผลลบกับ anti-B (DiaMed) และให้ผลลบกับ
anti-A พบ weak anti-B ในซีรัม (ให้ผล 1+ กับ B
cell ปกติ 7 ใน 10 ราย) การตรวจน้ำลายพบ H sub-
stance แต่ไม่พบ B substance บิดามีหมู่เลือด H,
RhD positive และ Le(a-b⁺) มารดาและน้องชายมี
หมู่เลือด A₁, H, RhD positive และ Le(a-b⁻) พบ
A และ H substance ในน้ำลาย ได้แสดง family
pedigree ไว้ในรูปที่ 2

การตรวจดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-SSP โดย amplify
O gene ที่ตำแหน่ง 261 ของ exon 6 พบว่าผู้บริจาค
และสมาชิกทุกคนในครอบครัวมี O allele ดังแสดงในรูป
ที่ 3 การตรวจหา ABO alleles ด้วยวิธี PCR-RFLP
และ PCR-SSP ที่บริเวณตำแหน่งต่างๆใน exon 6, 7



รูปที่ 3 The PCR-SSP pattern of O allele

Lane 1. DNA marker : 100 bp ladder DNA; Lane 2. control positive : genotype OO;

Lane 3. control negative : genotype AB; Lane 4. DNA of the father;

Lane 5. DNA of the mother; Lane 6. DNA of the donor; Lane 7. DNA of the brother

และ intron 6 ดังตารางที่ 3 พบว่าผู้บริจาคและบิดามี B, O¹ allele มารดาและน้องชายมี A¹(C467T), O¹ allele การทำ DNA sequencing ในผู้บริจาคและบิดา โดย PCR amplification เฉพาะ B gene ตรวจหา ลำดับเบสโดยใช้ forward และ reverse primers พบว่า nucleotide sequence ที่ตำแหน่ง 810-1,065 ของ exon 7 ของผู้บริจาคและบิดา โดยเปรียบเทียบกับ AF 134414 : ABO-B101 allele, complete cds (Yamamoto F) จาก GenBank เป็น B allele โดยมีตำแหน่ง 863 = T, 871 = G, 873 = C, 930 = A, 1,036 = A, 1,054 = C, 1,055 = G และ 1,062 = G ดังแสดงใน รูปที่ 4 ได้ติดตามผู้บริจาคมาตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี serology ซ้ำในเวลา 1 ปีถัดมา พบว่าผู้บริจาคมี B^{weak}

phenotype เหมือนเดิม

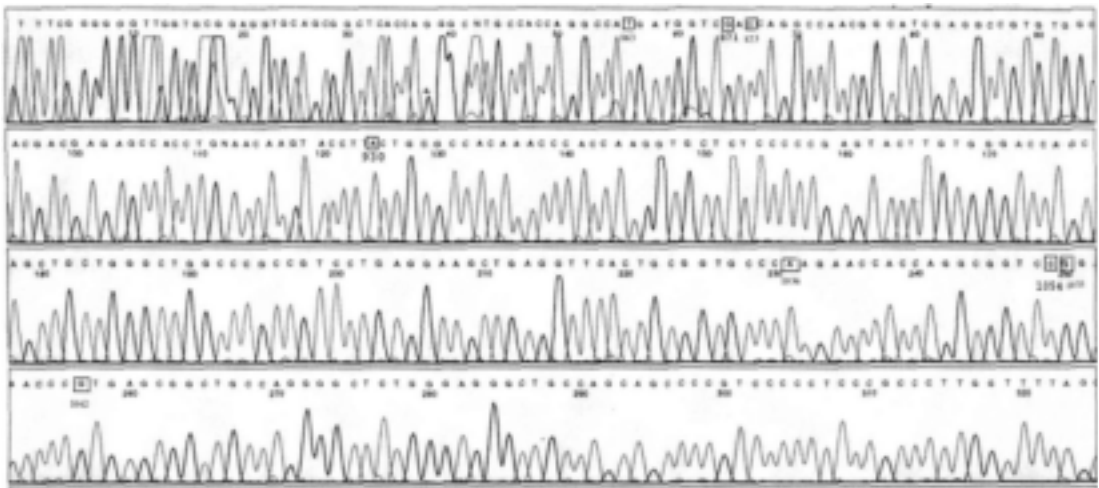
วิจารณ์

การแสดงลักษณะ phenotype ของหมู่เลือดระบบ ABO ถูกควบคุมด้วยยีน 3 กลุ่มคือ ABO gene, Hh gene และ secretor gene คนที่มี H gene (HH, Hh) จะสร้างเอนไซม์ L-fucosyltransferase ทำให้มีการเติม L-fucose กับสารตั้งก้ำเนิด (precursor) เป็นแอนติเจน H คนที่มี A gene (AA, AO) จะสร้างเอนไซม์ N-acetylgalactosaminyltransferase (A-transferase) ทำให้มีการเติม N-acetylgalactosamine ต่อจากแอนติเจน H เป็นแอนติเจน A คนที่มี B gene (BB, BO) จะสร้างเอนไซม์ D-galactosyltransferase (B-

ตารางที่ 3 Polymorphic nucleotides detectable by PCR-RFLP or PCR-SSP as used for ABO genotyping in this study.

Polymorphism detected		Nucleotide		
by PCR-		position	Mutation	Alleles detectable
RFLP	SSP			
<i>Bst</i> UI	-	188-189	GC→AT	O ^{1v}
<i>Kpn</i> I	+	261	G→-	O ¹ , O ^{1v} , O ¹ hybrids
<i>Hpa</i> II	-	467	C→T	Asian A ¹ , A ² , O ³ , cis-AB, O ¹ A ² hybrid
-	+	526	C→G	B, O ¹ -B hybrids
<i>Mbo</i> I	-	646	T→A	A ^x , A ^x hybrids, O ^{1v}
<i>Hpa</i> II	-	703	G→A	B, O ¹ -B hybrids
<i>Dde</i> I	-	771	C→T	A ^x hybrids, O ^{1v}
-	+	796	C→A	B
-	+	802	G→A	O ²
-	+	803	G→C	B
-	+	798-804	+ G	A ^{el} , O ³
<i>Sal</i> I	-	871	G→A	A ³ , B ^x
-	+	1,059-1,061	-C	A ² , O ³
<i>Hpa</i> II	-	1,096	G→A	B, O ²

+ = done; - = not done



รูปที่ 4 The electropherogram of the nucleotide sequence position 810-1065 in exon 7 of the donor (863 =T, 871 = G, 873 = C, 930 = A, 1036 = A, 1054 = C, 1055 = G, 1062 = G)

transferase) ทำให้มีการเติม D-galactose ต่อจาก แอนติเจน H เป็นแอนติเจน B^{2,10} ดังนั้นคนที่ขาด A gene และ B gene (OO) จึงมีเพียงแต่แอนติเจน H และคนที่ขาด H gene (hh) จึงไม่มีแอนติเจน H, A และ B ซึ่งพบได้น้อยมาก (Bombay and Parabombay phenotype) แอนติเจน A, B และ H นอกจากพบบน เม็ดเลือดแดงยังพบได้บน epithelial cell, lymphocyte, platelet และในสารคัดหลั่งเช่น น้ำลาย น้ำตา และ น้ำนม³ การหลั่ง A, B และ H substance ในสารคัดหลั่งถูกควบคุมด้วย secretor gene¹ คนที่มี secretor gene (SeSe, Sese) จะตรวจพบ H substance ในสารคัดหลั่งหรือพบร่วมกับ A substance หรือ B substance ในกรณีที่มี A gene หรือ B gene คนที่ขาด secretor gene หรือ nonsecretor (sese) จะไม่พบ A, B และ H substance ในสารคัดหลั่งไม่ว่าจะมี A gene, B gene และ H gene หรือไม่

ตำแหน่งที่ควบคุมการสร้าง ABO gene บนโครโมโซมคู่ที่ 9 ประกอบด้วย 7 exon coding sequence ส่วนใหญ่ (77%) อยู่บน exon 6 และ 7^{10,30} คนหมู่เลือด A ที่มี A¹ allele ประกอบด้วย nucleotide sequence จาก 7 exon รวม 1,065 base pair (AF

134412 : A101 allele, Yamamoto F) A¹ allele เป็น standard reference สำหรับเปรียบเทียบกับ allele อื่น คนหมู่เลือด B ที่มี B allele มี nucleotide sequence แตกต่างจาก A¹ allele ที่ exon 6 และ exon 7 7 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งเบสที่ 297 เปลี่ยนจาก adenine เป็น guanine (A297G), C526G, C657T, G703A, C796A, G803C และ G930A (AF 134414 : B101 allele, Yamamoto F) และที่ 3'-untranslated region (3'-UTR) 1 ตำแหน่งคือตำแหน่ง G1096A¹¹ คนหมู่เลือด O ที่มี O¹ allele มี nucleotide sequence แตกต่างจาก A¹ allele คือตำแหน่ง G261 deletion ที่ exon 6 (AF 134415 : O01 allele, Yamamoto F) ทำให้เกิด frameshift mutation และ premature stop codon ดังนั้นคนหมู่เลือด O จึงไม่สร้างเอนไซม์ A และ B-transferase ทำให้ไม่มีการสร้างแอนติเจน A และ แอนติเจน B

ผู้บริจาคมีหมู่เลือด B_{weak} เมื่อตรวจด้วยวิธี serology การศึกษาหมู่เลือดในครอบครัวพบว่าบิดามี B_{weak} phenotype เช่นเดียวกับผู้บริจาค มารดาและน้องชายมีหมู่เลือด A₁ การตรวจดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-RFLP และ PCR-SSP ที่ exon 6, 7 และ intron 6 พบว่าผู้บริจาค

และบิดามี B, O¹ allele มารดาและน้องชายมี A¹ (C467T), O¹ allele เนื่องจากตำแหน่ง 261 ของ exon 6 ของคนหมู่เลือด O ส่วนใหญ่มี G deletion ตำแหน่ง 261 นี้จึงนิยมใช้ตรวจหา O gene^{12,29} ซึ่งพบในสมาชิกทุกคนในครอบครัวของผู้บริจาค ตำแหน่ง 467 ใช้ตรวจ Asian A¹ allele ซึ่งพบ C467T ในมารดาและน้องชายและพบมากที่สุดในคนไทย^{13,31} ตำแหน่ง 526, 703, 796, 803, 871 และ 1,096 ใช้ตรวจ B allele เนื่องจากการตรวจ ABO gene ด้วยวิธี PCR-RFLP และ PCR-SSP เป็นการตรวจหา polymorphism ของ ABO gene ที่บางตำแหน่งของ ABO allele ผู้บริจาคและบิดาพบ B, O¹ allele จึงทำ DNA sequencing พบว่า nucleotide sequence ที่ตำแหน่ง 810-1,065 ของ exon 7 ของผู้บริจาคและบิดาเป็น B allele (ตำแหน่ง 863 = T, 871 = G, 873 = C, 930 = A, 1,036 = A, 1,054 = C, 1,055 = G และ 1,062 = G)

หมู่เลือด ABO มีลักษณะ heterogeneity คือหมู่เลือดที่มี phenotype เหมือนกัน อาจถูกควบคุมด้วยยีนที่แตกต่างกันเช่น คนหมู่เลือด O ที่มี O¹ allele มี nucleotide sequence ตำแหน่ง G261 deletion ทำให้เกิด frameshift และ stop codon คนที่มี O^{1v} allele มีตำแหน่ง G261 deletion ร่วมกับ mutant allele ที่ตำแหน่งอื่นเช่น T646A, C771T คนที่มี O² allele มีตำแหน่ง G261 ปกติแต่มี mutant allele ที่ตำแหน่ง G802A ทำให้การสร้าง amino acid เปลี่ยนแปลงโดย amino acid ตำแหน่งที่ 268 glycine เปลี่ยนเป็น arginine (Gly268Arg) คนที่มี O² allele จึงไม่สร้าง A หรือ B-transferase และการ crossing over หรือมี recombination และ gene conversion ระหว่าง A gene หรือ B gene กับ O gene (O^R allele) เช่น O¹-A² hybrid หรือ O^{1v}-B hybrid ทำให้เกิด stop codon คนที่มี O^R allele จึงไม่มีการสร้างแอนติเจน A หรือ B ทั้งๆ ที่มี A gene หรือ B gene¹¹ คน subgroup A และ subgroup B มีแอนติเจน A หรือ B อ่อนกว่าคน

ปกติเนื่องจากการมี mutant allele ทำให้ amino acid เปลี่ยนแปลงยังผลต่อ catalytic activity ของ A หรือ B-transferase³¹ ในคน A_x phenotype มี mutant allele ที่ตำแหน่ง T646A ทำให้ Phe216Ile หรือเกิดจากมี mutant allele ที่ตำแหน่ง T646A ร่วมกับ A-O^{1v} hybrid ที่ตำแหน่ง 188-226 ของ intron 6^{7,9} ใน intron 6 ซึ่งมี chimeric sequence เป็น hot spot ของการเกิด gene conversion^{17,21}

B allele มี coding nucleotide sequence จำนวน 1,065 base pair nucleotide sequence หลังตำแหน่ง 1,065 เป็น non-coding sequence หรือ 3'-UTR¹¹ subgroup B มีผู้ศึกษาไว้ค่อนข้างน้อย มีรายงาน B_{weak} phenotype จากการมี B^{weak} allele ซึ่งมี point mutation ที่ตำแหน่ง G539A, A548G, C721T, T863G, G871A, C873G, A1036G, G1055A ทำให้การสร้าง amino acid เปลี่ยนแปลง B^{el} allele เกิดจาก T641G, G669T และ B³ allele เกิดจาก C1054T ดังตารางที่ 4 ผู้บริจาคและบิดาพบ B allele จากการตรวจ PCR- RFLP และ PCR- SSP ที่ exon 6, 7 และ intron 6 และ nucleotide sequence ที่ตำแหน่ง 810-1,065 ของ exon 7 ปกติ ในการศึกษาที่ไม่สามารถทำ DNA sequencing ในทุกตำแหน่งของ B gene ของผู้บริจาคและบิดาได้เนื่องจากข้อจำกัดของ primer ทั้งสองรายอาจมี B^{weak} allele ซึ่งเกิดความผิดปกติของยีนที่ตำแหน่งอื่น ซึ่งไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีการตรวจที่มีอยู่ การพิสูจน์ว่าผู้บริจาคและบิดามีความผิดปกติของยีนที่ใดไหน ควรทำ DNA sequencing ที่ตำแหน่งอื่นของ exon 7, exon 6 และ intron 6 ซึ่งถ้าไม่พบความผิดปกติอาจต้องทำ DNA sequencing ที่ exon 1-5 รวมทั้ง enhancer และ promoter region promoter อยู่ที่บริเวณตำแหน่ง -118 ถึง -1 upstream exon 1 ประกอบด้วย GC boxes จำนวนมากซึ่งมีผลต่อขบวนการ transcription enhancer region อยู่ที่ตำแหน่ง -3800 บริเวณ 5'-UTR ประกอบด้วย mini-satellite

ตารางที่ 4 Known mutations in B alleles from the consensus sequence.¹¹

Exon	6	7																		
nt position	297	528	539	548	641	657	668	703	721	796	883	863	871	873	930	1036	1054	1055	1062	1096
Consensus ¹	A	C	G	A	T	C	G	G	C	C	G	T	G	C	G	A	C	G	G	G
Normal B																				
B - 1	G	G				T		A		A	C				A					A
B - 2	G	G				T		A		A	C									?
B - 3	G	G						A		A	C				A					?
B - 4	G					T		A		A	C				A					?
Weak B																				
B ^W - 1	G	G			G	T		A		A	C				A					?
B ^W - 2	G	G				T	T	A		A	C				A					?
B ^W	G	G				T		A		A	C				A		T			?
B ^W - 1	G	G				T		A		A	C		A		A					?
B ^W - 2	G	G				T		A		A	C			G	A					A
B ^W - 3	G	G				T		A	T	A	C				A					A
B ^W - 4	G	G		G		T		A		A	C				A					A
B ^W - 5	G	G	A			T		A		A	C				A					A
B ^W - 6	G	G				T		A		A	C				A	G				A
B ^W - 7	G	G				T		A		A	C				A			A		A
B ^W - 8	G	G				T		A		A	C	G			A					A
Amino acid	99	176	180	183	214	219	223	235	241	266	268	288	291	291	319	346	352	352	354	
Consensus	Thr	Arg	Arg	Asp	Met	His	Glu	Gly	Arg	Leu	Gly	Met	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Arg	Pro	
Change		Gly	His	Gly	Arg		Asp	Ser	Trp	Met	Ala	Arg	Asn	Glu		Glu	Trp	Gln		

■, indicates the position of an intron ; I, indicates the end of the reading frame, ie, stop codon

?, indicates that the nucleotide at this position was not described.

From Chester MA, Olsson ML. The ABO blood Group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001;15:181.

repeating sequence (43 base pair) มี transcription factor-binding motif ซึ่งมีผลต่อ rate of transcription subgroup A และ subgroup B นอกจากเกิดจากการมี mutant allele ยังเกิดจากการลดลงของจำนวน transcription ความผิดปกติของขบวนการ splicing ปัจจัยที่ผลต่อ post-transcription และตัวยับยั้งจากยีนที่ใกล้เคียง³¹ B_{weak} รายนี้ถ้า DNA sequencing ที่ exon 1-7, intron, promoter และ enhancer region แล้วไม่พบความผิดปกติ อาจจำเป็นต้องตรวจหาลำดับเบสของ mRNA เพราะบางคนมีเยื่อพันกิต แต่การนำเยื่อมา transcribe เป็น mRNA (splicing pattern) อาจแตกต่างกัน³⁰ การสร้างโปรตีนจึงเปลี่ยนแปลง

หมู่เลือด B_{weak} เมื่อเป็นผู้บริจาคโลหิตสามารถแยก

เม็ดเลือดแดง (packed red cell) ให้กับคนหมู่เลือด B ได้ และเนื่องจากตรวจพบมี weak anti-B ในซีรัมด้วย ดังนั้นถ้าจำเป็นต้องใช้พลาสมาให้เฉพาะผู้ป่วยหมู่ O เท่านั้น คนหมู่เลือด B_{weak} เมื่อเป็นผู้ป่วยที่ต้องรับโลหิต ควรรับเม็ดเลือดแดงจากคนหมู่เลือด O แต่การรับพลาสมาสามารถรับจากคนหมู่ B และ AB หมู่เลือด B_{weak} อาจสร้างปัญหาในการให้โลหิต เนื่องจากคนหมู่เลือด B_{weak} มีแอนติเจน B อ่อนกว่าคนหมู่เลือด B ปกติ ทำให้บางครั้งการตรวจหมู่เลือดด้วยวิธี slide test อาจไม่เห็นปฏิกิริยา และถ้าไม่ได้รับการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธีมาตรฐานในหลอดทดลองอาจวินิจฉัยผิดเป็นหมู่เลือด O ทำให้หน้าเม็ดเลือดแดง B_{weak} ไปให้คนหมู่เลือด O และถ้าการทำ crossmatching ไม่สมบูรณ์อาจทำให้เกิด transfusion reaction

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Professor Martin L Olsson, Blood Centre, University Hospital, Lund, Sweden ที่ตรวจ confirm PCR-RFLP, PCR-SSP และเจ้าหน้าที่ธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือต่อการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Quinley ED, ed. *Immunohematology : principles and practice*. 2nd, ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1998:91-132.
- Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland : Am Assoc Blood Banks, 1999: 269-93.
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, eds. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. London: Blackwell Science, 1997:115-50.
- Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood* 1996;88:2732-7.
- Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, et al. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system : 1. weak subgroups : A³ and B³ alleles. *Vox Sang* 1993;64:116-9.
- Barjas-Castro ML, Carvalho MH, Locatelli MF, Bordin S, Saad ST. Molecular heterogeneity of the A₃ subgroup. *Clin Lab Haematol* 2000;22:73-8.
- Olsson ML, Chester MA. Heterogeneity of the blood group A^x allele : genetic recombination of common alleles can result in the A_x phenotype. *Transfus Med* 1998;8:231-8.
- Hansen T, Namork E, Olsson ML, Chester MA, Heier HE. Different genotypes causing indiscernible patterns of A expression on A(e1) red blood cells as visualized by scanning immunogold electron microscopy. *Vox Sang* 1998;75:47-51.
- Olsson ML, Chester MA. Polymorphisms at the ABO locus in subgroup A individuals. *Transfusion* 1996;36: 309-13.
- Schenkel-Brunner H. *Human blood groups : chemical and biochemical basis of antigen specificity*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag Wien, 2000:54-183.
- Chester MA, Olsson ML. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001;15:177-200.
- Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schonitzer D. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996;88:1852-6.
- Yip SP. Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood* 2000;95:1487-92.
- Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, et al. Extensive polymorphism of ABO blood group gene : three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum Genet* 1996;97:777-83.
- Olsson ML, Chester MA. A rapid and simple ABO genotype screening method using a novel B/O² versus A/O² discriminating nucleotide substitution at the ABO locus. *Vox Sang* 1995;69:242-7.
- Olsson ML, Chester MA. Frequent occurrence of a variant O¹ gene at the blood group ABO locus. *Vox Sang* 1996;70:26-30.
- Olsson ML, Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Chester MA. Allele-specific primer PCR across intron 6 resolves potential genotyping errors caused by recombinant hybrid alleles at the ABO locus. *Transfusion* 1998;38: 3S.
- Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies : identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98: 1585-93.
- Lin-Chu M, Broadberry RE, Chiou PW. The B₃ phenotype in Chinese. *Transfusion* 1986;26:428-30.
- Chassaigne M, Lopez M, Krawczynska S, Saint-Paul B. Quantitative and thermodynamic study of B antigen in a family including individuals with phenotypes B₃ and AB₃. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1977;20:565-73.
- Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes.

- Immunogenetics* 2001;53:190-9.
22. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Banks, 1999:650-1.
 23. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Banks, 1999: 657-8.
 24. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Banks, 1999: 669.
 25. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Banks, 1999: 677-8.
 26. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Banks, 1999: 653-4.
 27. Vengelen-Tyler V, ed. *Technical manual*. 13th ed. Bethesda, Maryland: Am Assoc Blood Banks, 1999: 654-6.
 28. Miller SA, Dukes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215-8.
 29. Lee JC, Tsai LC, Chen CH, Chang JG. ABO genotyping by mutagenically separated polymerase chain reaction. *Forensic Sci Int* 1996;82:227-32.
 30. Yamamoto F. Molecular genetics of ABO. *Vox Sang* 2000;78(suppl 2):91-103.
 31. Olsson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus : a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus Med* 2001;11:295-313.

The B_{weak} Phenotype in a Thai Family

Ruangrong Cheepsattayakorn, Ladda Fongsatitkul*, Amornrat V. Romphruk***, Tanin Bhoopat**, Heinrich F. Steger**, Chanvit Leelayuwat**** and Sucheela Chomsook*

Department of Pathology; *Blood Bank; **Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, ***Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine; ****Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University.

Abstract: We reported two subjects with B_{weak} phenotype in the same family. The proband was a man who donated blood at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. The second subject was his father. ABO blood grouping of the donor gave negative reaction with anti-A, anti-B and anti-A,B (Thai Red Cross) by slide test so he was classified as group O. The cell grouping by standard tube test and gel test showed 2+ and mixed-field agglutination (mf) with anti-B and anti-A,B (Thai Red Cross) but showed negative reaction with anti-A and two monoclonal anti-B (from DiaMed and Bioscot). Weak anti-B was found in his serum but did not react with his own red cells. Antibody screening and direct antiglobulin test were negative. His saliva contained H substance while no B substance was detected. ABO genotyping of the subjects was performed by several methods including polymerase chain reaction using sequence specific primers (PCR-SSP) in exon 6, 7 and intron 6; polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in exon 6, 7 and DNA sequencing at nucleotide position 810-1,065 in exon 7 revealed two difference alleles and compatible with B, O¹ genotype. Family study demonstrated that his father had the same genotype and showed B_{weak} phenotype as the donor. His mother and his brother were blood group A₁. Both of them were heterozygous A¹(C467T), O¹. The genotype of B_{weak} of this report was different from the previous B^{weak} alleles which had point mutation at T863G, G871A, C873G, A1036G, G1055A or B³ allele which had C1054T in exon 7. Our B_{weak} phenotype may have B^{weak} allele which can not be detected by these methods. Neither history of serious illness nor previous blood transfusion was found in the donor and his father. Serologic study of the donor 1 year later revealed that he was B_{weak} phenotype. The B_{weak} donor may be at risk of mistyping as blood group O. This may have adverse consequences when transfusing the B_{weak} blood to group O recipients so the accurate ABO blood typing is very important in transfusion medicine.

Key Words : ● B_{weak} phenotype ● B allele ● PCR-SSP ● DNA sequencing

Thai J Hematol Transf Med 2002;12:77-90.