

# การตรวจหาจีโนไทป์ของ $FY^*A$ , $FY^*B$ และ $FY^*X$ ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

Detection of  $FY^*A$ ,  $FY^*B$  and  $FY^*X$  genotypes in Duffy blood group system by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

■ พูนทรัพย์ ผลาจรศักดิ์<sup>1\*</sup> ลักษมี จำรัสศรี<sup>2</sup> พียดา คงเทศน์<sup>3</sup>  
Poonsub Palacajornsuk<sup>1\*</sup> Laksamee Jamrassri<sup>2</sup> Phiyada Kongtes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> แขนงวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

<sup>1</sup> Division of Transfusion Sciences, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

<sup>2</sup> ห้องปฏิบัติการชันสูตร โรงพยาบาลคลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร

<sup>2</sup> Laboratory Public Health, Klong Klung Hospital

<sup>3</sup> กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และรังสีวิทยา โรงพยาบาลพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก

<sup>3</sup> Medical and Radical Laboratory, Promphiram Hospital

\* Corresponding author (E-mail: poonsub@yahoo.com)

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

## Abstract

**Research problems:** Serology method is the most commonly used for Duffy blood group phenotyping. This method is simple, convenient and inexpensive. However, mutation of  $FY^*$  gene at position C265T can cause a weak expression of  $Fy^b$  antigen and may not be detected by anti- $Fy^b$  which lead to false negative by serology testing. The objective of this study is to detect  $FY^*A$ ,  $FY^*B$  and  $FY^*X$  genotypes in Duffy blood group system by polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP).

**Materials and methods:** Ninety seven samples were tused for phenotyping of  $Fy^a$  and  $Fy^b$  by serology method and the DNA was extracted for detect  $FY^*A$  and  $FY^*B$  genotype by PCR-SSP.

**Results:** Phenotyping of 97 samples showed that 78 samples (80.41%) were  $Fy(a+b-)$  and 19 samples (19.59%) were  $Fy(a+b)$ . Seventy-eight DNA samples of  $Fy(a+b-)$  were then detected for  $FY^*X$  genotype at position C265T by PCR-SSP. The results showed no C265T mutation in all tested samples. The comparison results between serology and PCR-SSP methods were concordant.

**Conclusions:** PCR-SSP can be as alternative method to detect  $FY^*A$ ,  $FY^*B$  and  $FY^*X$  genotype in Duffy blood group system for selecting suitable blood to the patient who has anti- $Fy^a$  and/or anti- $Fy^b$  in order to prevent adverse effects of transfusion reaction and investigate for the cause of hemolytic disease of the newborn.

*Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 136-143. Doi: 10.14456/jams.2015.11*

**Keywords:** Genotype,  $FY^*A$ ,  $FY^*B$ ,  $FY^*X$ , Duffy, PCR-SSP

## บทคัดย่อ

**ที่มาของปัญหาวิจัย:** การตรวจหาฟีโนไทป์ของ  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ในหมู่เลือดระบบ Duffy นิยมใช้วิธีทางซีโรโลยี ข้อดี คือ ง่าย สะดวก และประหยัด แต่หากจีโนไทป์เป็น  $FY^X$  ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน Duffy ที่ตำแหน่ง C265T ทำให้มีการแสดงออกอย่างอ่อนของแอนติเจน  $Fy^b$  อาจตรวจไม่พบโดยการใช้ anti- $Fy^b$  การตรวจทางซีโรโลยีอาจพบความแรงของปฏิกิริยาต่ำทำให้อ่านเป็นผลลบได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของ  $FY^A$ ,  $FY^B$  และ  $FY^X$  ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

**วัสดุและวิธีการ:** นำตัวอย่างเลือด จำนวน 97 ราย มาตรวจหาฟีโนไทป์ของแอนติเจน  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ด้วยวิธีซีโรโลยี ตรวจหาจีโนไทป์ของ  $FY^A$ ,  $FY^B$  และ  $FY^X$  ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

**ผลการศึกษา:** พบ  $Fy(a+b-)$  จำนวน 78 ราย (80.41%) และ  $Fy(a+b+)$  จำนวน 19 ราย (19.59%) สกัด DNA จากตัวอย่างเลือด เพื่อนำไปตรวจหาจีโนไทป์ของ  $FY^A$  และ  $FY^B$  ด้วยวิธี PCR-SSP พบว่าการตรวจหาฟีโนไทป์ของแอนติเจน  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ด้วยวิธีซีโรโลยีให้ผลสอดคล้องกับการตรวจหาจีโนไทป์ของ  $FY^A$  และ  $FY^B$  นำ DNA ที่มีฟีโนไทป์  $Fy(a+b-)$  มาตรวจหาจีโนไทป์ของ  $FY^X$  ไม่พบการกลายพันธุ์ของจีโนไทป์ที่ตำแหน่งนี้

**สรุปผลการศึกษา:** ดังนั้นวิธี PCR-SSP สามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาจีโนไทป์ของ  $FY^A$ ,  $FY^B$  และ  $FY^X$  ในหมู่เลือดระบบ Duffy และมีประโยชน์ในการช่วยเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วยที่มี anti- $Fy^a$  และ/หรือ anti- $Fy^b$  เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์หลังจากได้รับเลือด และช่วยหาสาเหตุของภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอดได้

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 136-143. Doi: 10.14456/jams.2015.11

**คำรหัส:** จีโนไทป์,  $FY^A$ ,  $FY^B$ ,  $FY^X$ , Duffy, PCR-SSP

## บทนำ

แอนติเจน  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ของหมู่เลือดระบบ Duffy มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ co-dominant สามารถ ตรวจพบ phenotypes ได้ 4 แบบ คือ  $Fy(a-b+)$ ,  $Fy(a+b-)$ ,  $Fy(a-b-)$  และ  $Fy(a+b+)$  ความถี่ของ phenotype ในหมู่เลือดระบบ Duffy แตกต่างกันไปในประเทศแต่ละประเทศ ในประชากรไทย พบ  $Fy(a+b-)$  มากที่สุด รองลงมาพบ  $Fy(a+b+)$  ส่วน  $Fy(a-b+)$  พบน้อย และ  $Fy(a-b-)$  พบน้อยมาก<sup>1-6</sup>

แอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Duffy เป็น glycoprotein และทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของเชื้อมาลาเรีย ชนิด *Plasmodium vivax* และ *Plasmodium knowlesi* โดยแอนติเจน Duffy ทำหน้าที่เป็นตัวรับโปรตีนที่ยึดเกาะบนผิวเซลล์ของเชื้อ ในระยะที่อยู่ในเม็ดเลือดแดง คือ ระยะ merozoite โปรตีนที่ใช้ในการยึดเกาะเรียกว่า merozoite ligand บริเวณส่วนปลายของเชื้อ เรียกว่า apical end ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน คือ microneme และ rhoptry ที่มีความจำเพาะต่อการเข้าจับกับ glycoprotein ชนิดต่าง ๆ<sup>7</sup> ดังนั้นคนที่มี phenotype เป็น  $Fy(a-b-)$  ซึ่งไม่มีแอนติเจน Duffy จึงไม่พบการติดเชื้อ ประชากรในแอฟริกาตะวันตกส่วนใหญ่เป็น  $Fy(a-b-)$ <sup>8-10</sup> หากนำเม็ดเลือดแดงที่มี

แอนติเจนของหมู่เลือด Duffy ไป treat ด้วย proteolytic enzyme พบว่า receptor ของ  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  จะถูกกำจัดออกไปทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้<sup>1,2</sup>

ยีนที่กำหนดการสร้างแอนติเจนของหมู่เลือดระบบ Duffy มี 4 alleles อยู่บน exon ที่ 2 ของโครโมโซมที่ 1 (1q22-q23) ยีน  $FY^A$  และ  $FY^B$  มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันที่ตำแหน่ง 125G>A และมีกรดอะมิโนแตกต่างกัน คือ Gly42Asp โดย  $FY^A$  กำหนดการสร้างแอนติเจน  $Fy^a$  ( $Fy(a+)$ ) และ  $FY^B$  กำหนดการสร้างแอนติเจน  $Fy^b$  ( $Fy(b+)$ ) สำหรับ  $FY^FY$  มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันที่ตำแหน่ง -33T>C ที่ GATA-1 binding motif ของ  $FY^A$  และ  $FY^B$  ผู้มียีนแบบ  $FY^FY$  ไม่สามารถสร้างแอนติเจน  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ( $Fy(a-b-)$ ) ส่วน  $FY^X$  มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 265C>T และมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเป็น Arg89Cys ยีน  $FY^X$  สร้างแอนติเจน  $Fy^b$  ได้ปริมาณน้อย เมื่อนำเลือดของคนที่มีจีโนไทป์เป็น  $FY^X$  มาทำปฏิกิริยากับ Anti- $Fy^b$  จะไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง<sup>1-2,11-12</sup>

แอนติบอดีของหมู่เลือดระบบ Duffy เป็นชนิด immune type (IgG) สามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 37 °C

จากการถูกกระตุ้นโดยเม็ดเลือดแดงจากการรับเลือดหรือเคยตั้งครรภ์ แม้ว่าแอนติบอดีในระบบนี้ไม่ตรงคอมพลีเมนต์ แต่มีความสำคัญทางคลินิก เพราะส่งผลให้เม็ดเลือดแดงถูกทำลาย และมีอายุสั้นกว่าปกติหลังจากได้รับเลือด (hemolytic transfusion reaction, HTR) และ/หรือเกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกในเด็กแรกคลอดได้ (hemolytic disease of the newborn, HDN) ดังนั้นหากพบแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยจำเป็นต้องนำเลือดที่ไม่มีแอนติเจนที่ตรงกับแอนติบอดีที่พบไปให้แก่ผู้ป่วย<sup>1-2</sup>

การตรวจหา  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  แอนติเจน ใช้วิธีทางซีโรโลยี โดยนำเม็ดเลือดแดงมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะและอ่านผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง วิธีนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจน้อย แต่มีข้อจำกัดคือ แอนติบอดีที่ใช้ต้องมีความจำเพาะ ความแรง และความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม จึงสามารถเห็นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงอย่างชัดเจนได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นหากแอนติเจนของหมู่เลือดบนผิวของเม็ดเลือดแดงมีปริมาณน้อย อาจทำให้ตรวจไม่พบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงและเกิดความผิดพลาดในการอ่านและแปลผลได้<sup>3</sup> ปัจจุบันมีการศึกษาลำดับเบสของยีนหมู่เลือดระบบ Duffy<sup>1-2,14</sup> และมีการนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาตรวจหายีนของหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย<sup>15-19</sup> และสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหายีนของหมู่เลือดระบบ Duffy<sup>10-25</sup> เพื่อช่วยแก้ปัญหาในกรณีที่มีแอนติเจนปริมาณน้อยและไม่สามารถตรวจพบโดยวิธีทางซีโรโลยีได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ที่มิมีจีโนทัยป์  $FY^*$  ซึ่งมีการสร้างแอนติเจน  $Fy^b$  ได้ปริมาณน้อย เมื่อปฏิกิริยากับ anti- $Fy^b$  อาจเกิดการผิดพลาดในการอ่านและแปลผลได้<sup>26-29</sup> การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาจีโนทัยป์ของ  $FY^*A$ ,  $FY^*B$  และ  $FY^*X$  ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP)

## วัสดุและวิธีการ

### 1. ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือด ปริมาตร 2.5 mL โดยใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งจำนวน 97 ราย จากนักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 3 และ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามเอกสารเลขที่ 078E/55

### 2. การตรวจหาฟีโนทัยป์ของ $Fy^a$ และ $Fy^b$ โดยใช้วิธีซีโรโลยี

เตรียมตัวอย่างเลือดเป็น 5% red cell suspension หยด anti- $Fy^a$  และ anti- $Fy^b$  (Bio-Rad, Dreieich, Germany) อย่างละ 1 หยด ลงในแต่ละหลอดทดลอง ขนาด 12x75 mm จากนั้นหยด 5% red cell suspension ของตัวอย่างเลือดลงในหลอด anti- $Fy^a$  และ anti- $Fy^b$  หลอดละ 1 หยด เขย่าส่วนผสมของเซลล์และซีรัมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านผลและบันทึกผล จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ปั่นอ่านผลและบันทึกผล ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 % จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 45 วินาที ที่ 3,500 rpm เทน้ำเกลือออกให้หมดแล้วเติมน้ำยา anti-human globulins 1 หยด (National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Thailand) ปั่นอ่านผลทันที หากไม่มีปฏิกิริยาการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงให้ยืนยันผลโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกผล หลอดที่อ่านผลปฏิกิริยาเป็นผลลบให้เติม IgG-sensitized red cells 1 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นอ่านผลและบันทึกผลปฏิกิริยาการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง

### 3. การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่ 3,500 rpm นาน 5 นาที ใช้ transfer pipette ขนาด 1 mL ดูดเก็บส่วน buffy coat ใส่ในหลอดทดลองขนาด 12x75 mm เติม RBC-lysing reagent จำนวน 3 mL ผสมให้เข้ากันนาน 3 นาที แล้วปั่น 3,500 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งจากนั้นผสมโดยใช้ vortex mixer เพื่อให้ pellet กระจาย ทำซ้ำ อีก 2 ครั้ง จากนั้นเติม RBC-lysing reagent จำนวน 1 mL ผสมให้ pellet กระจายแล้วดูใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นที่ 5,000 rpm นาน 2 นาที จะได้ pellet ที่มีขนาดประมาณ 25  $\mu$ L เติม proteinase K 12  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 300  $\mu$ L, 10% SDS 105  $\mu$ L, เติม 7.5 M guanidine HCl 105  $\mu$ L ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วอุ่นใน dry block heater ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 10 นาที ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่าทำให้เกิดฟอง นำไปอุ่นอีกครั้ง อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสจำนวน 500  $\mu$ L ใส่หลอดทดลองขนาด 12x75 mm เติม absolute ethanol จำนวน 1 mL ดูดส่วนของ DNA มาใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL จำนวน 800  $\mu$ L นำไปปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติม 80% ethanol จำนวน 500  $\mu$ L ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นที่ 10,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเปิดฝา microcentrifuge tube แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 นาที ละลาย DNA ด้วย ddH<sub>2</sub>O จำนวน 100  $\mu$ L incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 นาที ผสมให้เข้ากันแล้วนำ DNA ไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis สูดท้ายวัดและคำนวณความเข้มข้นและ

ความบริสุทธิ์ของ DNA โดยเครื่อง UV spectrophotometer เก็บรักษา DNA ที่ได้เก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอการทดสอบ ขั้นตอนต่อไป

#### 4. การตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*A*, *FY\*B* และ *FY\*X* ใน หมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี PCR-SSP

นำ DNA จำนวน 97 ตัวอย่างมาตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*A* และ *FY\*B* โดยทำ PCR 2 หลอดต่อ DNA 1 ราย หลอดที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ FYA-FW และ FYAB-RV ที่จำเพาะต่อจีโนทัยป์ของ *FY\*A* ส่วนหลอดที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ FYB-FW และ FYAB-RV ที่จำเพาะต่อจีโนทัยป์ของ *FY\*B* แต่ละหลอดใส่ HGH5580F และ HGH5967R (human growth hormone gene) เป็น internal control primers และใช้ *FY\*A* และ *FY\*B* เป็น positive control และ negative control ตามลำดับควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

สำหรับการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*X* นำ DNA จำนวน 78 ราย ที่สกัดจากตัวอย่างเลือดที่มีฟีโนทัยป์ Fy(a+b+) มาทำ PCR 1 หลอดต่อ DNA 1 ราย โดยใช้ไพรเมอร์ FYB-FW และ FYX-RV จำเพาะต่อจีโนทัยป์ของ *FY\*X* โดยใช้ HGH5580F และ HGH5967R เป็น internal control primers โดยมี *FY\*X* positive control และ negative control ควบคู่ไปด้วย เตรียมส่วนผสมของน้ำยาต่างๆ ในการทำ PCR ปริมาตร 10 µL ประกอบด้วย DNA template 200 ng, dNTPs 0.2 mM (Invitrogen, Brazil), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Invitrogen, Brazil), 1X buffer (Invitrogen, Brazil), Taq polymerase 0.25 U (Invitrogen, Brazil), ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *FY\*A*, *FY\*B* หรือ *FY\*X* 25 ng (Bio Basic Inc., Bangkok, Thailand) และ ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ human growth hormone 12.5 ng (Bio Basic Inc., Bangkok, Thailand) (ตารางที่ 1) จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler (Gene Amp PCR System 9600, Roche Diagnostic systems, Connecticut, USA)

**Table 1.** Primers

Primer name	Primer sequence (5'→3')
FYA-FW	CCTTCCCAGATGGAGACTATGG
FYB-FW	CCTTCCCAGATGGAGACTATGA
FYX-RV	CAGGGCAGAGCTGCCAGCA
FYAB-RV	TAGCTTCCCAACCATCTTA
HGH5580F	TGCCCTTCCCAACCATCCCTTA
HGH5967R	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC

สภาวะในการทำ PCR ของการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*A* และ *FY\*B* ประกอบด้วย denature ที่อุณหภูมิ 95 °C, 1 นาที จำนวน 1 รอบ denature ที่อุณหภูมิ 95 °C, 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 66.2 °C, 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C, 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C, 30 วินาที จำนวน 1 รอบ สำหรับสภาวะในการทำ PCR ของการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*X* ทำเช่นเดียวกัน ยกเว้น ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 67 °C จากนั้นนำ PCR product ไปตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis แยกผ่านด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 volts นาน 40 นาที จากนั้นย้อมแผ่น gel ด้วย ethidium bromide นาน 5 นาที และวิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยเปรียบเทียบ PCR product ที่ได้กับ DNA marker ขนาด 100 bp DNA ladder (Fermentas, Utah, USA)

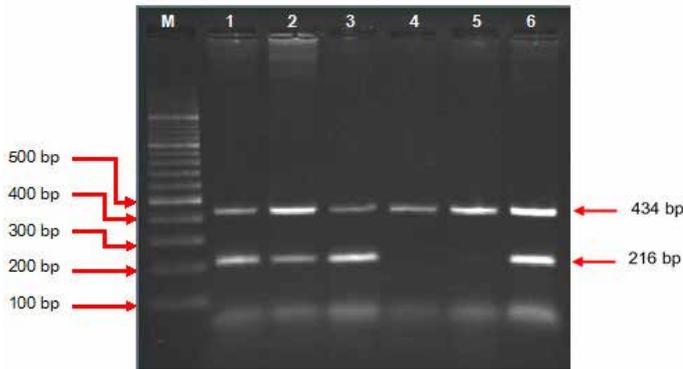
#### ผลการศึกษา

##### 1. ผลการตรวจหาฟีโนทัยป์ของ *Fy<sup>a</sup>* และ *Fy<sup>b</sup>* ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธีซีโรโลยี

จากผลการตรวจหาฟีโนทัยป์ของ *Fy<sup>a</sup>* และ *Fy<sup>b</sup>* ในหมู่เลือดระบบ Duffy จำนวน 97 ราย ตรวจพบ Fy(a+b-) จำนวน 78 ราย (ร้อยละ 80.41) และ Fy(a+b+) จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 19.59)

##### 2. ผลการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*A* และ *FY\*B* ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี PCR-SSP

ในการตรวจหาจีโนทัยป์ของ *FY\*A* และ *FY\*B* ในหมู่เลือดระบบ Duffy ต้องมี PCR product ของ internal control ขึ้นที่ตำแหน่ง 434 bp ทุกสาย จึงสามารถแปลผลได้ นอกจากนี้ PCR product ของ หลอด *FY\*A* และ *FY\*B* positive control ต้องมี specific PCR product ขนาด 216 bp และ PCR product ของ หลอด *FY\*A* และ *FY\*B* negative control ต้องไม่มี specific PCR product ขนาด 216 bp จึงสามารถแปลผลของตัวอย่าง DNA ที่ใช้ทดสอบได้ ดังแสดงในรูปที่ 1 จากผลการตรวจ DNA ของตัวอย่างเลือด จำนวน 97 ราย พบจีโนทัยป์ แบบ *FY\*A/FY\*B* จำนวน 78 ราย (ร้อยละ 18.41) และแบบ *FY\*A/FY\*B* จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 19.59)



**Figure 1.** Gel electrophoresis of *FY\*A* and *FY\*B* genotyping by PCR-SSP. Lane M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1-2: *FY\*A/FY\*B* genotype, Lane 3-4: *FY\*A/FY\*A* genotype, Lane 5-6: *FYB/FY\*B* genotype

### 3. ผลการเปรียบเทียบการตรวจหาฟีโนไทป์ และจีโนไทป์ของระบบหมู่เลือด Duffy

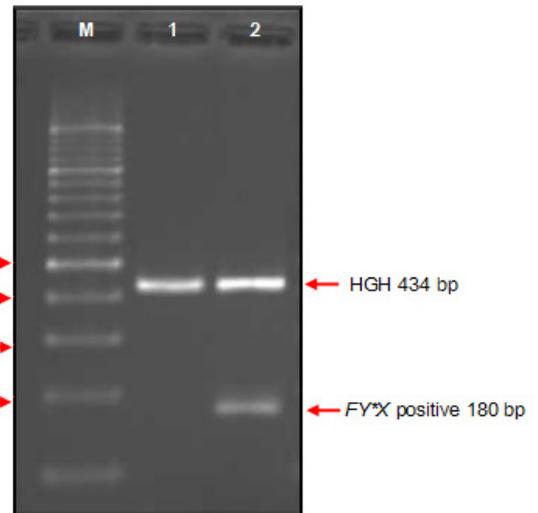
เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจฟีโนไทป์ด้วยวิธีซีโรโลยี และผลการตรวจจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-SSP พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

**Table 2.** Comparison of the results for the detection of phenotype and genotype in Duffy blood group system

Phenotypes	Genotypes	Number(%)
Fy (a+b-)	<i>FY*A/FY*A</i>	78 (80.41)
Fy (a+b+)	<i>FY*A/FY*B</i>	19 (19.59)
Total		97 (100)

### 4. ผลการตรวจหาจีโนไทป์ของ *FY\*X* ในหมู่เลือดระบบ Duffy โดยวิธี PCR-SSP

การตรวจหาจีโนไทป์ของ *FY\*X* หมู่เลือดระบบ Duffy จะแปลผลได้ ต้องมี PCR product ของ internal control ขึ้นที่ตำแหน่ง 434 bp และ PCR product ของ หลอด *FY\*X* positive control ต้องมี specific PCR product ขนาด 180 bp และตรวจไม่พบ PCR product ในหลอด *FY\*X* negative control ดังแสดงในรูปที่ 2 จากผลการตรวจ DNA ของตัวอย่างเลือดที่มีฟีโนไทป์ Fy(a+b-) จำนวน 78 ราย ไม่พบจีโนไทป์ของ *FY\*X*



**Figure 2.** Gel electrophoresis of *FY\*X* genotyping at position C265T by PCR-SSP.

Lane M: 100 bp DNA ladder marker, Lane 1: None *FY\*X* genotype, Lane 2: *FY\*X* genotype

### วิจารณ์ผลการศึกษา

การตรวจหาฟีโนไทป์ของ  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ด้วยวิธีซีโรโลยี พบ  $Fy(a+b-)$  และ  $Fy(a+b+)$  ประมาณ ร้อยละ 80 และร้อยละ 20 ตามลำดับ ซึ่งมีความถี่ใกล้เคียงกับที่มีการศึกษาในประชากรไทย สำหรับประชากรในประเทศแถบเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น และจีน มีความถี่ของ  $Fy(a+b-)$  มาก รองลงมา คือ  $Fy(a+b+)$ ,  $Fy(a-b+)$  และ  $Fy(a-b-)$  ตามลำดับ แตกต่างกับประชากรในประเทศทางแถบยุโรปมีความถี่ของ  $Fy(a+b+)$  มาก รองลงมา คือ  $Fy(a-b+)$ ,  $Fy(a+b-)$  และ  $Fy(a-b-)$  ตามลำดับ ส่วนประชากรในประเทศแอฟริกามีความถี่ของ  $Fy(a-b-)$  มาก รองลงมา คือ  $Fy(a-b+)$ ,  $Fy(a+b-)$  และ  $Fy(a-b-)$  ตามลำดับ<sup>1-6</sup> แอนติบอดีของระบบหมู่เลือดนี้เป็นชนิด IgG ไม่ตรึงคอมพลีเมนต์ และมีความสำคัญทางคลินิก จากการรายงานชนิดของแอนติบอดีต่อหมู่เลือดผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย<sup>30</sup> พบความถี่ของแอนติบอดีต่อหมู่เลือดระบบ Duffy ร้อยละ 2.7 และพบ anti- $Fy^b$  มากกว่า anti- $Fy^a$  หากพบแอนติบอดีชนิดใดในซีรัมของผู้ป่วยจำเป็นต้องจัดหาเลือดที่ไม่มีแอนติเจนที่ตรงกับแอนติบอดีที่พบไปให้แก่ผู้ป่วย<sup>1-2</sup>

เมื่อนำผลการตรวจหาฟีโนไทป์ของ  $Fy^a$  และ  $Fy^b$  ด้วยวิธีซีโรโลยีมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจหาจีโนไทป์ของ *FY\*A*, *FY\*B* และ *FY\*X* ในหมู่เลือดระบบ Duffy ด้วยวิธี PCR-SSP พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นการตรวจจีโนไทป์ของ *FY\*A*, *FY\*B* และ *FY\*X* ในหมู่เลือด Duffy ด้วยวิธี PCR-SSP จึงสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาจีโนไทป์ได้<sup>5, 14-22</sup>

นอกจากวิธี PCR-SSP แล้วยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ได้รับการตีพิมพ์ โดยใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจหายีนในหมู่เลือดนี้เช่นกัน เช่น วิธี PCR-RFLP, real-time PCR หรือ multiplex SNaPShot เป็นต้น<sup>15-25</sup> แม้ว่าวิธีการต่างๆ เหล่านี้จะใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีทางซีโรโลยี แต่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหาในกรณีที่มีแอนติเจนปริมาณน้อยๆ ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทางซีโรโลยี<sup>26-29</sup> การตรวจหายีนของหมู่เลือดระบบ Duffy มีประโยชน์ในการเลือกเลือดที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย ในกรณีที่ผู้ป่วยมี anti-Fy<sup>a</sup> และ/หรือ anti-Fy<sup>b</sup> ต้องเลือกเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีนั้นๆ ให้แก่ผู้ป่วยเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาจากการรับเลือด<sup>1, 2, 31-35</sup>

#### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักศึกษาสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเลือด รวมถึงขอขอบคุณ Marion E Reid และ Kim Hue Roye จาก Immunochemistry Laboratory, New York Blood Centre, New York, USA ที่เอื้อเฟื้อ DNA ของ Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> และ Fy<sup>x</sup> positive control ใช้ในงานวิจัยนี้

#### เอกสารอ้างอิง

1. Meny GM. The Duffy blood group system: a review. *Immunohematology*. 2010; 26: 51-6.
2. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML: Blood Group Antigen Facts Book, 3<sup>rd</sup> ed. San Diego, Academic Press, 2012.
3. Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Metaseta P, Pongsataporn S. Further study of Rh, Kell, Duffy, P, MN, Lewis and Gerbiech blood groups of the Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1979; 10: 209-11.
4. Shimizu Y, Kimura M, Settheetham-Ishida W, Duangchang P, Ishida T. Serotyping of Duffy blood group in several Thai ethnic groups. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997; 28: 32-5.
5. Peng CT, Tsai CH, Lee HH, Lin CL, Wang NM, Chang JG. Molecular analysis of Duffy, Yt and Colton blood groups in Taiwanese, Filipinos and Thais. *Kaohsiung J Med Sci*. 2000; 16: 63-7.
6. Nathalang O, Kuvanont S, Punyaprasiddhi P, Tasaniyanonda C, Sriphaisal T. A preliminary study of the distribution of blood group systems in Thai blood donors determined by the gel test. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001; 32: 204-7.
7. Zimmerman PA, Ferreira MU, Howes RE, Mercereau-Paujalon O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. *Adv Parasitol*. 2013; 81: 27-76.
8. Chitnis CE, Dhaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med*. 1996; 184: 1531-6.
9. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*. 1997; 89: 3077-91.
10. Zimmernam PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, et al. Emergence of Fy<sup>a</sup>(null) in a *Plasmodium vivax* endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 13973-7.
11. Murphy MT, Templeton LJ, Fleming J, Ferguson M, Peterkin M, Fraser RH. Comparison of Fy(b) status as determined serologically and genetically. *Transf Med*. 1997; 7: 135-41.

12. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, et al. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the *Fy(b)* allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol.* 1998; 103: 1184-91.
13. Garatty G. Where are we, and where are we going, with DNA-based approaches in immunohematology? Is serology finished? *Transfusion.* 2007; 47(suppl): 1S-2S.
14. Human Genome Variation Society: Blood Group Antigen Gene Mutation Database. NCBI, dbRBC. [cited 2015 Jan 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/home>.
15. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup> blood group polymorphism. *Human Genet.* 1995; 95: 407-10.
16. Reid ME. Overview of molecular methods in immunohematology. *Transfusion.* 2007; 47(Suppl): 10S-16S.
17. Hashmi G. Red blood cell antigen phenotype by DNA analysis. *Transfusion.* 2007; 47(Suppl): 40S-6S.
18. Sellami MH, Kaabi H, Mibouni B, Dridi A, Mojaat N, Boukef MK, et al. Duffy blood group system genotyping in an urban Tunisian population. *Ann Hum Biol.* 2008; 35: 406–5.
19. Malgomgrfe W, Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393: 1443-51.
20. Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion.* 1998; 38: 168-73.
21. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion.* 2000; 40: 310-20.
22. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion.* 2007; 47(Suppl): 28S-31S.
23. Prager M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique. *Transfusion.* 2007; 47(1 Suppl): 54S-9S.
24. Palacajornsuk P, Halter C, Isakova V, Tarnawski M, Farmar J, Reid ME, et al. Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. *Transfusion.* 2009; 49: 740-9.
25. Reid ME. Applications and experience with PCR-based assays to predict blood group antigens. *Transfus Med Hemother.* 2009; 36: 168-78.
26. Tournamille C., Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy<sup>x</sup> individuals. *Blood.* 1998; 92: 2147-56.
27. Ansart-Pirenne H, Martin-Blanc S, Le Pennec PY, Rouger P, Cartron JP, Tournamille C. *FY\*X* real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis associated with a complete one-step real-time *FY* genotyping. *Vox Sang.* 2007; 92: 142–7.
28. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, et al. *Br Haematol.* The Fy<sup>x</sup> phenotype is associated with a missense mutation in the Fy<sup>b</sup> allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. 1998; 103: 1184–91.

29. Gassner C, Kraus RL, Dovic T, Kilga-Nogler S, Utz I, Mueller TH, Schunter F, Schoenitzer D. Fy<sup>x</sup> is associated with two missense point mutations in its gene and can be detected by PCR-SSP. *Immunohematology*. 2000; 16: 61-7.
30. ภาวิณี คุปต์วินทุ, มรกต เอ็มทีพย์, ดวงพร สังข์นุ่น, ภูรยา โอวาทกา, วิมล มานะกุล, สุดาวรรณ ลิ้มธรรมมาภรณ์ และคณะ. แอนติบอดีของหมู่เลือดชนิดต่างๆ ในผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*. 2553; 20: 255-62.
31. Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy(a) and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med*. 1997; 7: 301-4.
32. Olteanu H, Gerber D, Partridge K, Sarode R. Acute hemolytic transfusion reaction secondary to anti-Fy3. *Immunohematology*. 2005; 21: 48-52.
33. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion*. 2008; 48: 941-52.
34. Cotorruelo C<sup>1</sup>, Biondi C, Racca L, Borrás SG, Racca A. Duffy genotyping facilitates transfusion therapy. *Clin Exp Med*. 2009; 9: 249-51.
35. Guelsin GA, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, et al. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *J Clin Lab Anal*. 2010; 24: 311-6.