

นิพนธ์ต้นฉบับ

ระยะเวลาที่ใช้ในการบีบแยกส่วนประกอบโลหิตด้วยเครื่องบีบแยกอัตโนมัติที่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงชนิด leukocyte poor packed red cells

ตรึงตรา สีสารังสรรค์ อาจารย์ย์ กล่อมเอี่ยมลือ สุเพ็ญวรรณ กิตติทรัพย์กาญจนา ปิยวดี วิทยาวิวัฒน์ นฤมล วรรณ
จรรยา ประชัญญะ และ พิมล เชื้อยวลี
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

บทนำ การผลิตส่วนประกอบโลหิตชนิด leukocyte poor packed red cells (LPRC) ด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติระบบ top and bottom ควรใช้เวลาในการบีบแยกน้อยกว่า 240 วินาที (4 นาที) แต่อย่างไรก็ตาม หากใช้เวลาการบีบแยกที่น้อยไปอาจมีอัตราการเกิด hemolysis สูงขึ้นได้ **วัตถุประสงค์** การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา % hemolysis ใน LPRC ที่ได้จากการบีบแยกด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติระบบ top and bottom ซึ่งใช้ระยะเวลาการบีบแยกน้อยกว่า 240 วินาที (4 นาที) **วิธีการศึกษา** เปรียบเทียบข้อมูลอัตราการเกิด hemolysis ของ LPRC ที่บีบแยกจากเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติ Kawasumi KL-521 ที่ต้องจำหน่ายทั้งเนื่องจากการไม่ผ่านการตรวจสอบ hemolysis ด้วยสายตาในวันที่ 3 และเปรียบเทียบค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ โดยแบ่ง LPRC ดังกล่าวเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ LPRCs-120 และ LPRCs-240 ซึ่งใช้เวลาในการบีบแยก 80 ถึง 120 วินาที และ 121 ถึง 240 วินาที ตามลำดับ **ผลการศึกษา** จากการตรวจสอบ hemolysis ด้วยสายตาในวันที่ 3 พบว่า LPRCs-120 เกิด hemolysis จำนวน 16 ยูนิต จากทั้งหมด 966 ยูนิต (1.66%) ส่วน LPRCs-240 เกิด hemolysis จำนวน 12 ยูนิต จากทั้งหมด 100 ยูนิต (12.00%) ค่าเฉลี่ย % hemolysis ณ วันหมดอายุ ของ LPRCs-120 และ LPRCs-240 คิดเป็น 1.18% และ 0.25% ตามลำดับ โดยพบ LPRCs-120 ที่มีค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ เกิน 0.8% จำนวน 12 ยูนิต จากทั้งหมด 16 ยูนิต และพบ LPRCs-240 ที่มีค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ เกิน 0.8% จำนวน 1 ยูนิต จากทั้งหมด 12 ยูนิต ทั้งนี้ เวลาที่ใช้ในการบีบแยกของ LPRCs-120 อยู่ระหว่าง 80 ถึง 120 วินาที มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 102.81 วินาที (ต่ำสุด 80 วินาที สูงสุด 120 วินาที) ส่วน LPRCs-240 ใช้เวลาในการบีบแยกระหว่าง 131 ถึง 239 วินาที มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 166.92 วินาที (ต่ำสุด 131 วินาที สูงสุด 239 วินาที) **สรุป** การผลิต LPRC ที่ใช้เวลาในการบีบแยกระหว่าง 80 ถึง 120 วินาที มีค่าเฉลี่ย % hemolysis สูงกว่า LPRC ที่ใช้เวลาในการบีบแยกระหว่าง 121 ถึง 240 วินาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการบีบแยกส่วนประกอบโลหิตเพื่อผลิต LPRC ควรอยู่ระหว่าง 120 - 240 วินาที

คำสำคัญ : ● การแตกของเม็ดเลือดแดง ● เม็ดเลือดแดงที่มีเม็ดเลือดขาวต่ำ ● เวลาในการบีบแยก

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2562;29:195-203.

Original article

Effect of the separation time by using an automated blood separator on the hemolysis of leukocyte poor packed red cells

Treungtra Leelarungsun, Arjaree Klomiamsira, Supenwan Kitisapkanjana, Piyawadee Wittayawiwat,

Chanya Prungchaiyaphum, Narumon Worachun and Pimol Chiewsilp

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: The leukocyte poor packed red cells (LPRC) separated from whole blood using quadruple top and bottom bag system usually takes less than 240 seconds. However, the less separation time may cause the higher rate of red cells hemolysis. **Objective:** The aim of this study was to investigate whether hemolysis of LPRC is increased when shorter separation time is applied. **Materials and Methods:** Divide LPRC separated by Kawasumi KL-521 automated separators into 2 groups, separation time within 80 - 120 seconds (LPRCs-120) and 121 - 240 seconds (LPRCs-240). Compare % hemolysis at the end of storage (days 42) and hemolysis rate of LPRCs-120 and LPRCs-240 detected by visual inspection on days 3. **Results:** By visual inspection, 16 in 966 units of LPRCs-120 (1.66%) and 12 in 100 units of LPRCs-240 (12.00%) were detected as hemolyzed samples. At the end of storage, it was found that the average % hemolysis of LPRCs-120 and LPRCs-240 were 1.18% and 0.25%, respectively, 12 in 16 units of LPRCs-120 and 1 in 12 units of LPRCs-240 had > 0.8% hemolysis. The average separation time of LPRCs-120 was 102.81 seconds (minimum 80 seconds, maximum 120 seconds), and the average separation time of LPRCs-240 was 166.92 seconds (minimum 131 seconds, maximum 239 seconds). **Conclusion:** LPRCs separated within 80 - 120 seconds exhibited a higher mean % hemolysis than 121 - 240 seconds of separation ($p < 0.05$). Therefore, the commonly use separation time not more than 240 seconds is suitable as confirmed by this study. Then, the lower limit of separation time should be considered not less than 120 seconds.

Keywords : ● Hemolysis ● Leukocyte poor packed red cells ● Separation time

J Hematol Transfus Med. 2019;29:195-203.

บทนำ

การแตกของเม็ดเลือดแดง (red blood cell hemolysis) เป็นภาวะที่ผนังเซลล์ของเม็ดเลือดแดงถูกทำลายส่งผลให้สารต่าง ๆ โดยเฉพาะโพแทสเซียม (potassium) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ถูกปลดปล่อยออกมา¹ กรณีที่เม็ดเลือดแดงเกิด hemolysis ขึ้น ฮีโมโกลบินอิสระ (free hemoglobin) จะกระจายตัวอยู่ในพลาสมาหรือน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant solution) หรือน้ำยาเสริม (additive solution) ตามกลไกปกติ free hemoglobin จะแตกตัวเป็น dimer ไปจับกับ haptoglobin และถูกกำจัดออกไปผ่าน reticuloendothelial system หากมีปริมาณ free hemoglobin เกิดขึ้นมากกว่าปริมาณของ haptoglobin จะทำให้เกิดภาวะ hemoglobinemia ส่งผลให้ผู้ป่วยที่ได้รับส่วนประกอบโลหิตมีโอกาสที่จะเกิดภาวะแทรกซ้อนรุนแรงกับระบบไตและระบบหัวใจและหลอดเลือดจากการรับโลหิตได้^{1,2}

เนื่องจากโมเลกุลของ haptoglobin สามารถจับกับ dimer ของ hemoglobin ได้ 2 โมเลกุล หรือประมาณ 1 กรัม ต่อพลาสมา 1 ลิตร ดังนั้นการรับโลหิตที่มีปริมาณ free hemoglobin ไม่เกิน 3 กรัม หรือเทียบเท่ากับส่วนประกอบโลหิตประเภทเม็ดเลือดแดงจำนวน 10 ยูนิต ที่แต่ละยูนิตมีเปอร์เซ็นต์ของ hemolysis ไม่เกิน 0.5% จะไม่ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ hemoglobinemia² แม้ว่าการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (The US Food and Drug Administration) ไม่ได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานเกี่ยวกับระดับการเกิด hemolysis ในส่วนประกอบโลหิตไว้ แต่ในปี ค.ศ. 2017 Council of Europe ได้กำหนดเกณฑ์มาตรฐานให้ส่วนประกอบโลหิตประเภทเม็ดเลือดแดงต้องมีระดับการเกิด hemolysis ณ วันหมดอายุ (% hemolysis at the end of storage) น้อยกว่า 0.8% โดยมีเปอร์เซ็นต์ของเกณฑ์ผ่านเท่ากับ 90% ของตัวอย่างสุ่ม³

การเกิด hemolysis ในส่วนประกอบโลหิตประเภทเม็ดเลือดแดงเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ สภาวะการเก็บรักษา เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตส่วนประกอบโลหิตที่ทำให้เม็ดเลือดแดงถูกแรงกระทำ เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการเจาะเก็บ การกรอง การปั่นแยก การบิบแยก จนถึงขั้นตอนการจัดส่งส่วนประกอบโลหิตให้แก่โรงพยาบาล²

เมื่อปั่นแยกเลือดออกเป็นส่วน ๆ ได้แก่ packed red cells (PRC) platelet concentrates (PC) และพลาสมา (plasma) พบว่า PRC ยังคงมีเม็ดเลือดขาว (white blood cells; WBC) อยู่ประมาณ $1-3 \times 10^{10}$ cells/unit⁴ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์จากการให้เลือดแก่ผู้ป่วย ได้แก่ ภาวะไข้จากการให้เลือด (febrile nonhemolytic transfusion reaction,

FNHTR), HLA alloimmunization และการติดเชื้อ cytomegalovirus (CMV)^{4,5} ดังนั้นการลดจำนวน WBC ในเลือดจะช่วยลดและป้องกันการเกิดผลข้างเคียงดังกล่าว ซึ่งตามมาตรฐานของ American Association of Blood Banks (AABB) กำหนดว่าปริมาณ WBC ที่สามารถป้องกันการเกิด febrile reaction ได้คือ $\leq 5 \times 10^8$ cells/unit และปริมาณ WBC ที่สามารถป้องกันการเกิด HLA alloimmunization และการติดเชื้อ CMV ได้คือ $\leq 5 \times 10^6$ cells/unit⁶⁻⁸ นอกจากนี้การให้ส่วนประกอบโลหิตที่มี WBC ต่ำ เช่น filtered leukocyte poor packed red cells แก่ผู้ป่วยธาลัสซีเมียสามารถลดอุบัติการณ์ของ FNHTR และ HLA alloimmunization ลงได้อีกด้วย⁹

การผลิต LPRC โดยการแยก WBC ออกจากส่วนประกอบโลหิตมีหลายวิธี เช่น การปั่นเอาชั้น buffy coat ออกโดยวิธี inverted centrifugation สามารถลด WBC ได้ประมาณ 80% เหลือ WBC $< 1.2 \times 10^9$ cells/unit การกรอง WBC ในขณะที่ให้เลือดผู้ป่วย (bed side leukofiltration) สามารถลด WBC ให้เหลือ $\leq 5 \times 10^6$ cells/unit แต่ถ้าเป็นการกรองโลหิตที่มีอายุหลายวัน จะมีการ release ของ cytokines จำนวนมากทำให้เกิดกระบวนการ immune hemolysis ขึ้นได้⁸ ปัจจุบันจึงมีการใช้วิธีการกรองเอา WBC ออกก่อนการให้โลหิตแก่ผู้ป่วย (prestorage filtration) เพื่อผลิต leukodepleted packed red cells (LDPRC) ซึ่งเหลือ WBC น้อยกว่า 1×10^6 cells/unit

ในช่วงปี ค.ศ. 1980 ได้มีการพัฒนาเทคนิคการเตรียมส่วนประกอบโลหิตโดยใช้เครื่องบิบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติขึ้นเพื่อลดปริมาณ WBC ในส่วนประกอบโลหิต โดยทำการแยก buffy coat ซึ่งประกอบด้วย WBC และเกล็ดเลือด (platelet) ออกด้วยเครื่องบิบแยกอัตโนมัติซึ่งมี 2 ระบบ คือ top and bottom และ top and top¹⁰ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้นำเทคนิคการบิบแยกด้วยเครื่องบิบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติระบบ top and bottom มาใช้ เพื่อลดปริมาณ WBC ในส่วนประกอบโลหิตมานานกว่า 10 ปี โดยเฉพาะส่วนประกอบโลหิตชนิด LPRC ซึ่งแต่ละโรงพยาบาลมีความต้องการใช้ของผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น ขณะที่เทคโนโลยีการทำงานของเครื่องก็ได้รับการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติใช้เครื่องบิบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติของ Kawasumi รุ่น KL-521 ซึ่งเป็นเครื่องบิบแยกที่สามารถทำงานได้พร้อมกัน 2 หัวบิบ และรองรับปริมาณการผลิตส่วนประกอบโลหิตที่เพิ่มขึ้นได้ ทั้งนี้เพื่อตอบสนองต่อปริมาณความต้องการใช้ของโรงพยาบาลทั่วประเทศ อย่างไรก็ตาม ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 เป็นต้นมา ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ได้รับคืนส่วนประกอบโลหิตชนิด LPRC จากฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ และต้องจำหน่ายทิ้งเนื่องจากเกิด hemolysis โดยการตรวจสอบด้วยตา (visual inspection) จำนวนมาก เฉลี่ยเดือนละ 2.01% และ 1.91% ในปี พ.ศ. 2560 และ พ.ศ. 2561 ตามลำดับ โดยเมื่อนำ LPRC ที่ได้รับคืนดังกล่าวส่งตรวจวิเคราะห์หาค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ พบว่ามี LPRC ที่ % hemolysis เกิน 0.8% ถึง 47.29 % ของ LPRC ที่ได้รับคืน และ 0.59% ของ LPRC ที่ผลิตทั้งหมด ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิตจึงนำปัญหาดังกล่าวมาทำเป็นโครงการพัฒนางานอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนการเกิด hemolysis ใน LPRC ให้ต่ำกว่า 0.5% โดยเริ่มจากการค้นหาข้อมูลเพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุการเกิด hemolysis ในกระบวนการผลิต และพบว่าเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การหยิบจับถุงโลหิต/ส่วนประกอบโลหิตในขั้นตอนต่างๆ ทำให้เกิดแรงกระทำต่อเม็ดเลือดแดงภายในถุง ความไม่สมบูรณ์ของการหักข้อต่อ (breakable pin) ที่ขั้วถุง LPRC ทำให้ขณะบีบแยกโลหิตด้วยระบบ top and bottom เกิดแรงกระทำต่อเม็ดเลือดแดงที่ไหลผ่านขั้วดังกล่าว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายถุงและขั้วถุง LPRC ไม่สัมพันธ์กัน ทำให้เกิดความดันขณะเม็ดเลือดแดงไหลสู่ขั้วที่มีขนาดเล็กลง และถูกแรงกระทำ รวมถึงความเร็ว (speed) ในการบีบแยกเม็ดเลือดแดงด้วยระบบ top and bottom เมื่อทราบสาเหตุแล้วจึงนำไปสู่การแก้ไขและป้องกันโดยให้ข้อมูลและกำชับเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตทุกขั้นตอนเพิ่มความระมัดระวังในการหยิบจับโลหิตและส่วนประกอบโลหิตอย่างเบามือ และกำชับให้เจ้าหน้าที่ทำการหักข้อต่อที่ขั้วถุง LPRC อย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อให้เม็ดเลือดแดงไหลผ่านอย่างสมบูรณ์ รวมถึงการปรับค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติเพื่อลดความเร็วในการบีบแยกส่วนประกอบโลหิต ซึ่งนำมาสู่การศึกษาระยะเวลาการบีบแยกส่วนประกอบโลหิตในงานวิจัยนี้

การผลิตส่วนประกอบโลหิตของฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิตใช้การบีบแยกด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติระบบ top and bottom ซึ่งใช้เวลาในการบีบแยกน้อยกว่า 240 วินาที (4 นาที) แต่ไม่ควรเกิน 360 วินาที (6 นาที) เนื่องจากจะทำให้เม็ดเลือดแดงมีแนวโน้มที่จะเกิด hemolysis จากการศึกษานี้ในปี ค.ศ. 2012 ของ Gkoumassi E และคณะ พบว่า เม็ดเลือดแดงที่ใช้เวลาการบีบแยกมากกว่า 6 นาที มีค่าเฉลี่ย % hemolysis สูงกว่าเม็ดเลือดแดงที่บีบแยกด้วยเวลาน้อยกว่า 6 นาที¹¹ อย่างไรก็ตามหากใช้เวลาการบีบแยกที่น้อยเกินไปจะทำให้เครื่องบีบแยกต้องใช้แรงดันสูงขึ้นในการบีบแยกเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงถูกแรงกระทำมากขึ้น และอาจมีอัตราการเกิด hemolysis สูงขึ้นได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา % hemolysis ในส่วนประกอบโลหิตประเภทเม็ดเลือดแดงชนิด LPRC ที่ได้จากการบีบ

แยกด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติระบบ top and bottom ซึ่งใช้ระยะเวลาการบีบแยกน้อยกว่า 240 วินาที (4 นาที) ทั้งนี้ เพื่อนำผลจากการศึกษาไปปรับความเร็วที่เหมาะสมที่ใช้ในการบีบแยกส่วนประกอบโลหิตด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติเพื่อลดปัญหาการเกิด hemolysis และลดจำนวน LPRC ที่ต้องจำหน่ายทิ้ง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้การศึกษา

ใช้ LPRC ที่เจาะเก็บและผลิตในวันที่ 6 ธันวาคม พ.ศ. 2560 จำนวน 1,165 ยูนิต ซึ่งผ่านกระบวนการผลิต ดังนี้

1. ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิต นำโลหิตรวม (whole blood; WB) ที่เจาะเก็บด้วยถุงบรรจุโลหิตชนิด quadruple top and bottom bag ขนาด 450 mL (Karmi, Kawasumi, Korat, Thailand) มาปั่นและบีบแยกด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติ Kawasumi รุ่น KL-521 ซึ่งมีโปรแกรมซอฟต์แวร์บันทึกข้อมูลในการบีบแยก เช่น ระยะเวลาในการบีบ น้ำหนักของ RBC, buffy coat และ plasma ก่อนส่ง LPRC ให้ฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์เพื่อรอจ่ายให้โรงพยาบาล

2. ฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ จะตั้ง LPRC ไว้ในตู้เย็นที่ 1-6 °C เพื่อให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน ก่อนตรวจสอบ hemolysis ในวันที่ 3 นับจากวันที่เจาะเก็บ โดยพิจารณาจากสีของ supernatant ด้วยสายตา แยก LPRC ที่พบ hemolysis ส่งคืนกลับมาที่ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิตเพื่อจำหน่ายทิ้ง

3. ก่อนทำการจำหน่าย LPRC ดังกล่าวทั้ง ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิตจะเก็บ LPRC ที่อุณหภูมิ 1-6 °C จนถึงวันหมดอายุ แล้วส่งให้ฝ่ายควบคุมคุณภาพดำเนินการตรวจวิเคราะห์หาค่า % hemolysis at the end of storage ของแต่ละยูนิต ตามข้อกำหนดมาตรฐานของ Council of Europe ด้วยวิธีการดังนี้

- 3.1 หาค่าความเข้มข้นของ total hemoglobin (Hb) ด้วยวิธี cyanmethemoglobin method โดยใช้ตัวอย่างโลหิตละลายใน drabkin's reagent ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และใช้ spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้สารมาตรฐาน hemoglobin เพื่อระบุค่าของ total Hb

- 3.2 หาค่า supernatant hemoglobin โดยวิธี colorimetric technique ทำโดยปั่นแยกตัวอย่างโลหิตแล้วนำเฉพาะส่วนน้ำเหลืองมาละลายใน leuco crystal violet solution และ 1% hydrogen peroxide นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.3 คำนวณหา % hemolysis ณ วันหมดอายุ ของ LPRC แต่ละยูนิต โดยคำนวณจากสูตร¹²

$$\frac{\text{Supernatant hemoglobin (g/dL)}}{\text{Total hemoglobin (g/dL)}} \times [100 - \text{hematocrit (\%)}]$$

วิธีการ

1. นำ LPRC แต่ละยูนิตที่ได้รับคืนจากฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ มาตรวจสอบระยะเวลาที่ใช้ในการบิบแยกจากข้อมูลที่บันทึกในโปรแกรมซอฟต์แวร์ของเครื่องบิบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติ เริ่มตั้งแต่การบิบแยก plasma ออกจากถุง WB จนกระทั่งการบิบแยกเม็ดเลือดแดงสิ้นสุด โดยแบ่ง LPRC ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามระยะเวลาในการบิบแยก กล่าวคือ กลุ่มที่ 1 ใช้เวลาบิบแยก 80-120 วินาที (LPRCs-120) กลุ่มที่ 2 ใช้เวลาบิบแยก 121-240 วินาที (LPRCs-240)

2. คำนวณหาค่าเฉลี่ยของ % hemolysis (at the end of storage) ของ LPRC แต่ละกลุ่ม

3. เปรียบเทียบข้อมูลค่าเฉลี่ยของ % hemolysis ณ วันหมดอายุของ LPRC ทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้หลักสถิติ pair t-test โดยที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 จะถือว่า ค่าเฉลี่ยของ % hemolysis ดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษา

ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิตทำการบิบแยกและบิบแยกส่วนประกอบโลหิตจนได้ LPRC จำนวนทั้งหมด 1,165 ยูนิต เมื่อตรวจสอบข้อมูลระยะเวลาที่ใช้บิบแยกจากโปรแกรมซอฟต์แวร์ของเครื่องบิบแยกพบว่า มี LPRC ที่ใช้เวลาบิบแยก 80-120 วินาที จำนวน 966 ยูนิต (82.92%) LPRC ที่ใช้เวลาบิบแยก 121-240 วินาที

จำนวน 100 ยูนิต (8.58%) และ LPRC ที่ใช้เวลาบิบแยกมากกว่า 240 วินาที แต่ไม่เกิน 360 วินาที จำนวน 99 ยูนิต (8.50%)

เมื่อส่ง LPRC ดังกล่าวให้ฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์แล้ว ตั้งไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 1-6°C และตรวจสอบ hemolysis ของ LPRC ด้วยสายตาในวันที่ 3 พบว่ามี LPRC ที่เกิด hemolysis จำนวน 28 ยูนิต โดยเมื่อแยกกลุ่มตามระยะเวลาที่ใช้ในการบิบแยก ในช่วงที่ต้องการศึกษา พบว่าเป็น LPRC ที่ใช้เวลาบิบแยกระหว่าง 80-120 วินาที (LPRCs-120) จำนวน 16 ยูนิต จากทั้งหมด 966 ยูนิต และเป็น LPRC ที่ใช้เวลาบิบแยกระหว่าง 121-240 วินาที (LPRCs-240) จำนวน 12 ยูนิต จากทั้งหมด 100 ยูนิต คิดเป็นอัตราการเกิด hemolysis 1.66% และ 12.00% ตามลำดับ

จากข้อมูลที่บันทึกในโปรแกรมซอฟต์แวร์ของเครื่องบิบแยก พบว่า LPRCs-120 ใช้เวลาในการบิบแยกระหว่าง 80-120 วินาที มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 102.81 วินาที ส่วน LPRC-240 ใช้เวลาในการบิบแยกระหว่าง 131-239 วินาที มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 166.92 วินาที ดังแสดงใน Table 1

หลังจากเก็บ LPRC ทั้ง 2 กลุ่ม ไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 1-6°C จนกระทั่งถึงวันหมดอายุ คือวันที่ 42 และนำมาตรวจวิเคราะห์หาค่า % hemolysis พบว่า LPRCs-120 มีค่าเฉลี่ย % hemolysis เท่ากับ 1.18% และ LPRCs-240 มีค่าเฉลี่ย % hemolysis เท่ากับ 0.25% ดังแสดงใน Table 1 ทั้งนี้ พบว่า LPRCs-120 จำนวน 12 ยูนิต จากทั้งหมด 16 ยูนิต และ LPRCs-240 จำนวน 1 ยูนิต จากทั้งหมด 12 ยูนิต มีค่า % hemolysis เกิน 0.8% ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานของ European guideline³ โดยมีอัตราการเกิด hemolysis คิดเป็น 1.24% และ 1.00% ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

Table 1 Separation time and % hemolysis at the end of storage of LPRCs-120 and LPRCs-240

Parameters	Separation times (seconds)		%hemolysis (at the end of storage)	
	LPRCs-120	LPRCs-240	LPRCs-120	LPRCs-240
	N = 16	N = 12	N = 16	N = 12
Average	102.81	166.92	1.18	0.25
Maximum	120	239	2.51	0.83
Minimum	80	131	0.40	0.07

Table 2 The number of hemolyzed samples and hemolysis rate detected by visual inspection and analysis of % hemolysis at the end of storage

Parameters	Number of hemolyzed samples (units)	
	LPRCs-120	LPRCs-240
	N = 966	N = 100
Visual inspection at day 3	16 (1.66 %)	12 (12.00 %)
% hemolysis > 0.8 (at the end of storage)	12 (1.24 %)	1 (1.00 %)

ทั้งนี้จากการดำเนินโครงการพัฒนางานอย่างต่อเนื่องเพื่อลดปัญหาการเกิด hemolysis ใน LPRC โดยการปรับความเร็วในการบีบของเครื่องบีบแยกเพื่อเพิ่มระยะเวลาในการบีบแยกให้เหมาะสม การลดแรงกระทำต่อเม็ดเลือดแดงจากการหีบจับถุงเลือดในขั้นตอนต่างๆ ระหว่างการผลิต การลดอัตราการหักข้อต่อที่ไม่สมบูรณ์ และการปรับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายถุงและขั้วถุง LPRC ให้สัมพันธ์กัน ส่งผลให้อัตราการส่งคืน LPRC จากฝ่ายจ่ายโลหิตฯ เนื่องจาก hemolysis ลดเหลือเพียง 0.18% ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2562 และเหลือเพียง 0.04% ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาตัวอย่าง LPRC ที่ส่งคืนจากฝ่ายจ่ายโลหิต เมื่อตั้งไว้ในห้องเย็นนาน 3 วัน และพบว่ามีการเกิด hemolysis ซึ่งพบว่าการผลิต LPRC โดยใช้การบีบแยกด้วยเครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติระบบ top and bottom ที่ใช้เวลาในการบีบแยกระหว่าง 80 ถึง 120 วินาที มีค่าเฉลี่ย % hemolysis สูง

กว่า LPRC ที่ใช้เวลาในการบีบแยกระหว่าง 121 ถึง 240 วินาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษานี้ สรุปได้ว่าไม่ควรใช้เวลาในการบีบแยกน้อยกว่า 120 วินาที

อย่างไรก็ตาม LPRC ที่ใช้เวลาในการบีบแยกที่เหมาะสมตามการศึกษาของ Gkoumassi E และคณะ คืออยู่ระหว่าง 240 ถึง 360 วินาที¹¹ ยังพบ hemolysis ได้ ซึ่งอาจเกิดจากเหตุปัจจัยอื่นๆ เช่น ความหลากหลายและการตั้งค่าของเครื่องบีบแยกแต่ละรุ่น และคุณสมบัติของถุงบรรจุโลหิตแต่ละบริษัท ซึ่งส่งผลให้อัตราการเกิด hemolysis ไม่สอดคล้องกับ Gkoumassi E และคณะ และผลการศึกษานี้ จากข้อมูลการทำ process validation กระบวนการผลิตส่วนประกอบโลหิตด้วยระบบ top and bottom โดยใช้เครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติของบริษัท Kawasumi รุ่น KL-521 กับถุงบรรจุโลหิตที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ (NBC) เมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 พบว่า LPRC ที่บีบแยกระหว่าง 241 ถึง 360 วินาที มีค่าเฉลี่ย % hemolysis ณ วันหมดอายุ เท่ากับ 0.51% กลับสูงกว่า LPRC ที่บีบแยกระหว่าง 121 ถึง 240 วินาที ซึ่งมีค่าเฉลี่ย % hemolysis ณ วันหมดอายุ

Table 3 The number of hemolyzed LPRC returned from Blood and Blood Product Distribution Department during January 2018 to July 2019

Period	Hemolyzed LPRC (units)	Total LPRC (units)	Hemolysis rate (%)
January 2018	431	35,262	1.22
February 2018	305	33,181	0.92
March 2018	487	38,015	1.28
April 2018	1,082	36,474	2.97
May 2018	1,120	34,316	3.26
June 2018	1,476	37,106	3.98
July 2018	2,000	39,585	5.05
August 2018	868	42,574	2.04
September 2018	468	35,891	1.30
October 2018	356	38,741	0.92
November 2018	243	35,100	0.69
December 2018	389	36,299	1.07
January 2019	63	35,193	0.18
February 2019	28	34,377	0.08
March 2019	60	38,486	0.16
April 2019	43	32,254	0.13
May 2019	22	34,438	0.06
June 2019	11	35,921	0.03
July 2019	16	36,582	0.04

Table 4 % hemolysis at the end of storage of LPRC separated between 80 to 120, 121 to 240 and 241 to 360 seconds

Separation period (seconds)	80 - 120	121 - 240	241 - 360
Kawasumi KL-521 automated separator with NBC blood bags			
N	-	11	15
Average % hemolysis at the end of storage	-	0.27% (min. 0.17%, max. 0.50%)	0.51% (min. 0.18%, max. 2.26%)
Average separation time (seconds)	-	213.91 (min. 184, max. 235)	254.47 (min. 241, max. 271)
JMS automated separator with JMS blood bags			
N	9	18	-
Average % hemolysis at the end of storage	0.51% (min. 0.21%, max. 1.32%)	0.51% (min. 0.13%, max. 1.83%)	-
Average separation time (seconds)	112.11 (min. 101, max. 118)	140.00 (min. 121, max. 215)	-

เท่ากับ 0.27% นอกจากนี้ จากข้อมูลการทำ process validation กระบวนการผลิตส่วนประกอบโลหิตด้วยระบบ top and bottom โดยใช้เครื่องบีบแยกส่วนประกอบโลหิตอัตโนมัติและถุงบรรจุโลหิตของบริษัท JMS เมื่อเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 พบว่า LPRC ที่บีบแยกระหว่าง 80 ถึง 120 วินาที มีค่าเฉลี่ย % hemolysis ณ วันหมดอายุ เป็น 0.51% ซึ่งเท่ากับ LPRC ที่บีบแยกระหว่าง 121 ถึง 240 วินาที แต่กลับพบว่า LPRC ที่มีค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ สูงที่สุดคือ 1.83% บีบแยกโดยใช้เวลา 165 วินาที ดังแสดงใน Table 4

นอกเหนือจากระยะเวลาที่ใช้ในการบีบแยกส่วนประกอบโลหิตแล้ว จากการวิเคราะห์สาเหตุการเกิด hemolysis ในโครงการพัฒนางานอย่างต่อเนื่องเพื่อลดปัญหาการเกิด hemolysis ใน LPRC พบว่ายังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่เกี่ยวข้องและส่งผลต่อการเกิด hemolysis เช่น การหีบจับถุงโลหิตและส่วนประกอบโลหิตในขั้นตอนต่างๆ ที่ทำให้เกิดแรงกระทำต่อเม็ดเลือดแดงภายในถุง ความไม่สมบูรณ์ของการหักข้อต่อ (breakable pin) ที่ขั้วถุง LPRC ทำให้ขณะบีบแยกโลหิตด้วยระบบ top and bottom เกิดแรงกระทำต่อเม็ดเลือดแดงที่ไหลผ่านขั้วดังกล่าว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสายถุงและขั้วถุง LPRC ไม่สัมพันธ์กัน กล่าวคือ ขนาดของสายถุงใหญ่กว่าขนาดของขั้วถุง ทำให้เกิดความดันขณะเม็ดเลือดแดงไหลสู่ขั้วที่มีขนาดเล็ก และถูกแรงกระทำ เป็นต้น ซึ่งจากการดำเนินโครงการพัฒนางานอย่างต่อเนื่องดังกล่าว ส่งผลให้อัตราการส่งคืน LPRC จากฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ เนื่องจาก hemolysis ลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ความสำเร็จในการแก้ไขปัญหาการเกิด hemolysis ดังที่กล่าวมาแล้วนั้น นอกจากจะเป็นการเพิ่มคุณภาพ ลดปริมาณการจำหน่าย

ทั้ง และมูลค่าการสูญเสียของส่วนประกอบโลหิตชนิด LPRC แล้ว ยังถือเป็นการเพิ่มปริมาณ LPRC ให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ป่วยอีกด้วย ซึ่งที่ผ่านมาศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติได้เพิ่มปริมาณการผลิต LPRC ขึ้นอย่างต่อเนื่อง แทนการผลิต PRC ซึ่งมี WBC ปนเปื้อนปริมาณมาก ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลข้างเคียงต่างๆ จากการรับเลือดเนื่องจาก WBC เช่น FNHTR, HLA alloimmunization และการติดเชื้อ CMV นอกจากนี้ LPRC ยังเป็นทางเลือกสำหรับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย หรือผู้ป่วยที่ได้รับการทำ stem cells transplantation ซึ่งจำเป็นต้องได้รับส่วนประกอบโลหิตชนิดที่เป็น leuko reduction แต่ไม่สามารถหาเลือดชนิดดังกล่าวได้

จากข้อมูลในการศึกษานี้ยังพบว่า การประเมินการเกิด hemolysis จากสีของ supernatant ด้วยสายตาในวันที่ 3 หลังการเจาะเก็บนั้นอาจไม่แม่นยำเพียงพอ และไม่สอดคล้องกับค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ กล่าวคือ จากการประเมินด้วยสายตา พบว่ามี LPRCs-120 เกิด hemolysis จำนวน 16 ยูนิต แต่มีเพียง 12 ยูนิต ที่มีค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ Council of Europe (> 0.8%) เช่นเดียวกับ LPRCs-240 ซึ่งจากการประเมินด้วยสายตา พบว่าเกิด hemolysis จำนวน 12 ยูนิต แต่มีเพียง 1 ยูนิต ที่มีค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ ไม่ผ่านเกณฑ์ ดังแสดงใน Table 2 จะเห็นว่าการประเมิน hemolysis ด้วยสายตามีความคลาดเคลื่อนถึง 25% และ 75% ตามลำดับ ในทางกลับกัน LPRC ที่พบว่าไม่เกิด hemolysis จากการประเมินด้วยสายตาซึ่งไม่มีข้อมูลการตรวจ % hemolysis ณ วันหมดอายุ อาจพบว่า % hemolysis ไม่ผ่านเกณฑ์ได้ นอกจากนี้ การประเมินด้วยสายตาทำในวันที่ 3 หลังวันที่เจาะเก็บ ส่วนการตรวจวิเคราะห์หาค่า % hemolysis ทำ ณ วันหมดอายุ ซึ่งไม่ได้ทำในช่วงเวลา

เดียวกัน อีกทั้งเกณฑ์มาตรฐานของ Council of Europe กำหนดให้พิจารณาตัดสินการเกิด hemolysis จากค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ จึงไม่อาจสรุปได้ว่าในวันที่ 3 หลังการเจาะเก็บ LPRC มี % hemolysis เท่าใด และผ่านเกณฑ์หรือไม่

จากการศึกษาของ Ana-Maria Simundic และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 ที่เปรียบเทียบความแม่นยำของการประเมิน hemolysis ใน serum specimen ด้วยสายตา (visual detection) กับการใช้เครื่องอัตโนมัติ (automated detection) พบว่าการประเมินตัวอย่างด้วยสายตามีความน่าเชื่อถือต่ำกว่าการใช้เครื่องอัตโนมัติ¹³ เนื่องจากความไม่แม่นยำของการประเมิน hemolysis ด้วยสายตาดังกล่าว ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิตจึงทดลองนำแถบสีมาตรฐานระบบสีของ Pantone หรือ Pantone Matching System (PMS) มาใช้ในการเทียบสีของ supernatant ใน LPRC ที่ได้รับคืนจากฝ่ายจ่ายโลหิตและผลิตภัณฑ์ เพื่อประเมินระดับความแรงของการเกิด hemolysis ทั้งนี้ Pantone เป็นมาตรฐานของระบบสีที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุดในงานพิมพ์ ซึ่งผู้พิมพ์รายใดก็ตามที่ใช้ระบบ Pantone ในการพิมพ์จะได้สีของสิ่งพิมพ์เหมือนกันและไม่ผิดเพี้ยน จากการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับสีของ supernatant ใน LPRC ดังกล่าว จำนวน 15 ยูนิต หลังจากตั้งไว้ให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอนในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 1-6 °C แล้วใช้แถบสีมาตรฐาน Pantone เทียบสีของ supernatant ทุกสไลด์าร์ ตั้งแต่สไลด์าร์ที่ 1 ถึงสไลด์าร์ที่ 5 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปสีของ supernatant มีอัตราการเพิ่มความเข้มที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าอัตราการแตกของเม็ดเลือดแดงใน LPRC แต่ละยูนิตมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม กลับพบว่าค่า % hemolysis ณ วันหมดอายุ ไม่สอดคล้องกับระดับความเข้มของสีที่เทียบได้จากแถบสีระบบ Pantone กล่าวคือ LPRC ที่มีระดับความเข้มสูงกลับมีค่า % hemolysis ต่ำกว่า LPRC ที่มีระดับความเข้มต่ำ ความไม่สอดคล้องกันดังกล่าวอาจเนื่องมาจากค่า % hemolysis ที่แปรผันตามสัดส่วนของ hemoglobin และ % hematocrit ใน LPRC แต่ละยูนิต ซึ่งเมื่อนำไปคำนวณในสูตรการหาค่า % hemolysis แล้วอาจไม่แปรผันตามระดับความเข้มของสี supernatant นอกจากนี้ อาจมีปัจจัยด้านทักษะในการเทียบสีโดยใช้แถบสีระบบ Pantone ที่ต้องใช้สายตามนุษย์ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนในการประเมินเช่นเดียวกัน

ด้วยข้อจำกัดต่างๆ ในการประเมินระดับการเกิด hemolysis ดังกล่าว หากในอนาคตสามารถพัฒนาวิธีการประเมินเบื้องต้นได้ไม่จำเป็นการใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติหรือเครื่องมือวัดระดับสีที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงการสร้างเกณฑ์มาตรฐานของ % hemolysis โดยไม่ต้องรอถึงวันหมดอายุ ก็จะทำให้ความคลาดเคลื่อนในการประเมินลดลง ส่งผลให้ปริมาณการจำหน่ายทั้ง LPRC ลดลงได้

สรุป

การศึกษานี้พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบีบแยกส่วนประกอบโลหิตเพื่อผลิต LPRC ควรอยู่ระหว่าง 120 ถึง 240 วินาที ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิด hemolysis ลดจำนวนการจำหน่ายทั้งส่วนประกอบโลหิตชนิด LPRC ส่งผลให้มีส่วนประกอบโลหิตสำรองจ่ายให้แก่ผู้ป่วยมากขึ้น และสามารถลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการรับโลหิตเนื่องจากการแตกของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิงพิมล เชื้อวชิรศิลป์ ผู้จัดการระบบคุณภาพ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่กรุณาให้คำแนะนำออกแบบการศึกษานี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร์ ที่ปรึกษาศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการเขียนต้นฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการเก็บรวบรวมข้อมูลสำหรับงานวิจัยนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่ฝ่ายควบคุมคุณภาพ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจวิเคราะห์ส่วนประกอบโลหิตที่ใช้ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Heaton A. Red blood cell hemolysis: an old standard in changing times. *Transfusion*. 2009;49:2551-54.
2. Samuel O, Sowemimo-Coker. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfusion Med Rev*. 2002;16:46-60.
3. Council of Europe. Guide to the preparation use and quality assurance of blood components. 19th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2017.
4. Bandarenko N, Brecher ME. Transfusion of leukocytes. *Williams Hematology*. 2001;6:1893-904.
5. Fisher M, Chapman JR, Ting A, Morris TJ. Alloimmunization to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelet suspensions. *Vox Sang*. 1985;49:331-5.
6. American Association of Blood Banks. Technical manual. 13rd ed. Bethesda: Maryland; 1996.
7. Sithivanit S. The quality of leukocyte-poor packed red cells preparation from the terumo automatic component extractor (T-ACE®). *Vajira Med J*. 2006;50:187-91.
8. Chiewsilp P. Immunological transfusion reaction. *J Hematol Transfus Med*. 1998;8:261-68.
9. Isaragkura P. Ideal Transfusion for Thalassemia. *J Hematol Transfus Med*. 2000;10:219-24.

10. Leelanuntawong T. Comparison of leukocyte poor packed red cells for quality control of blood components prepared by Opti-system and inverted spin method. *J Prapokklao Hosp Clin Med Educat Center*. 2010;27:83-95.
11. Gkoumassi E, Dijkstra-Tiekstra MJ, Hoentjen D, de Widt-Eggen J. Hemolysis of red blood cells during processing and storage. *Transfusion*. 2012;52:489-92.
12. Bhakbhumpong T. Review of quality control of blood components. *J Hematol Transfus Med*. 2010;20:205-10.
13. Ana-Maria S, Nora N, Valentina I, Dragica F, Bojana M, Marina K, et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:1361-1365.

