

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาประสิทธิภาพของการแช่แข็งและการล้างผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งด้วยเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor, Haemonetics

อำนาจ ศิริวงษ์ วรรณทิพย์ ทรงคงดวงดี พลอยมณี สุวรรณวุฒิชัย มรกต เอมทิพย์ และ ศิริลักษณ์ เพ็ญเจริญ
ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

บทนำ ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้รักษาโรคทางการแพทย์ในผู้ป่วยที่สูญเสียเลือดหรือมีเลือดในร่างกายไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย เช่น ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โรคโลหิตจางจากไขกระดูกฝ่อ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และผู้ป่วยที่มีเลือดหายากในคนไทย (rare blood type) ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของธนาคารเลือด ที่ช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาเลือดหายาก เพื่อให้ นำเลือดหายากมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้ทันเวลาที่ **วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการแช่แข็งเม็ดเลือดแดงและการล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งด้วยเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor, Haemonetics ในผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย **วัสดุและวิธีการ** คัดเลือกเลือดของผู้บริจาคจำนวน 14 ยูนิต บันทึกค่าฮีมาโตคริต (hematocrit; Hct) และน้ำหนักของเลือดในเครื่องอัตโนมัติ เพื่อให้เครื่องเติม glycerol ในปริมาณที่เหมาะสมเข้าไปในถุงสำหรับแช่แข็ง หลังจากนั้นปั่นแยกเอา supernatant glycerol ออกแล้วนำเลือดไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานมากกว่า 1 สัปดาห์ จากนั้นนำเลือดออกมาทำ deglycerolization ประกอบด้วยการนำเลือดมาละลาย ติดตั้ง set เข้าเครื่อง จากนั้นบันทึกค่า Hct และน้ำหนักเลือดหลังการอุ่นเลือดในเครื่องอัตโนมัติและใช้น้ำยา SAG-M เป็นน้ำยารักษาสภาพเซลล์ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุหลังการล้าง 72 ชั่วโมง การตรวจคุณภาพหลังการล้างประกอบด้วย ค่า Hct ค่า hemolysis ค่า osmolality และ ผล bacterial culture ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 5 หลังจากการล้างเซลล์ **ผลการศึกษา** พบว่า ก่อนการแช่แข็งค่าเฉลี่ย Hct ตั้งต้นเท่ากับ 74.2% และผลการทดสอบหลังการล้างในวันที่ 0 และ 5 มีค่า Hct อยู่ที่ 37.9-55.1% ค่า hemolysis 0.11-0.98% ค่า osmolality 342-386 mOsm/kg และปราศจากเชื้อในวันที่ 0-4 พบว่ามีการสูญเสียความเข้มข้นของเลือดไปประมาณ 39.4% **สรุป** จากการศึกษาการแช่แข็งเม็ดเลือดแดงด้วยเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พบว่า ช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาเลือดได้ยาวนานและล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งด้วยเครื่องอัตโนมัติแบบระบบปิด ผลการควบคุมคุณภาพผ่านเกณฑ์ตามมาตรฐาน The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM, Council of Europe) และ Association for the Advancement of Blood & Biotherapies (AABB) โดยภายหลังการล้างเซลล์มีเวลาในการใช้เลือดได้นาน 72 ชั่วโมง ซึ่งช่วยขยายเวลาในการขนส่งเลือดไปยังโรงพยาบาลต่างจังหวัด ส่งผลให้ผู้ป่วยที่มีเลือดหายากเข้าถึงกระบวนการรักษาได้ทันเวลา

คำสำคัญ : ● กระบวนการแช่แข็ง ● ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงแช่แข็ง ● กระบวนการล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็ง
● ดิกลิเซอไรส์เรดเซลล์

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2566;33:29-37.

ได้รับต้นฉบับ 23 มกราคม 2566 แก้ไขบทความ 14 กุมภาพันธ์ 2566 รับลงตีพิมพ์ 2 มีนาคม 2566

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นายอำนาจ ศิริวงษ์ ศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0 2263 9600-99 ต่อ 1330 และ 1331 e-mail: aumnaj.s@redcross.or.th

Original article

A study of the effectiveness for glycerolization and deglycerolization blood of ACP215 Automated Cell Processor, Haemonetics

Aumnaj Siriwong, Ponthip Songkhongduangdee, Ploymanee Suwanwootichai, Morakot Emthip and

Sirilak Phiancharoen

National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Introduction: Red blood cell products are for medical use for patients who lose blood or have insufficient blood for the needs of the body. For instance, patients with thalassemia, aplastic anemia, acute leukemia, etc. and Thai patients with rare blood types. Therefore, frozen red blood cell are an alternative blood products that extends the shelf-life of rare blood to be immediately utilized to treat patients on time. **Objective:** To study the efficiency of glycerolization and deglycerolization of frozen red blood cells with the ACP215 Automated Cell Processor, Haemonetics in red blood cell products of blood donors of National Blood Centre, Thai Red Cross Society. **Materials and Methods:** Altogether, 14 units of blood from donors were studied by enter the Hct, and blood weight in the machine, then the machine will add the appropriate volume of glycerol into the freezing bag. After centrifugation, the glycerol supernatant is removed, then freeze the blood product at -80 degrees Celsius for more than 1 week. Then take the bag out for deglycerolization and connect to set deglycerolization by install set to the machine and enter Hct and blood weight after warming up in the machine. The SAG-M solution was used as cell preservative solution that kept the red blood cells for 72 hours. The quality controlling after washing included determining the hematocrit, hemolysis, osmolarity, and bacterial culture results on days 0-5. **Results:** It was found that the average of Hct before freezing was 74.2%. but, the quality test results after washing on day 0-5 had Hct values of 37.9-55.1%, hemolysis was 0.11-0.98%, osmolarity was 342.0-386.0 mOsm/kg, and sterility test on day 0-4 were negative. Totally found that the loss of blood concentration is about 39.4%. **Conclusion:** From this study, it has been shown that red blood cell freezing with the ACP215 Automated Cell Processor can freeze blood at -80 degrees Celsius to help extend the storage time of the blood. The frozen red blood cells can also be washed with the Automated in a closed system and the quality control results meet the standard guidelines. After deglycerolization the blood can be used for 72 hours, which provide additional time of blood transportation to the hospital so that the patients with rare blood can access the treatment process promptly.

Keywords : ● Glycerolization ● Frozen red cells ● Deglycerolization ● Deglycerolized red cells
● Beta thalassemia

J Hematol Transfus Med. 2023;33:29-37.

บทนำ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย มีภารกิจในการจัดหาผู้บริจาคโลหิตให้มีปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการของผู้ป่วยทั่วประเทศ โดยองค์การอนามัยโลก ตั้งเป้าหมายว่าจะต้องจัดหาผู้บริจาคโลหิตให้ได้ถึงร้อยละ 3 ของประชากรประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยมีประชากร 69 ล้านคน ซึ่งในภาพรวมประเทศไทยสามารถจัดหาโลหิตได้ร้อยละ 4.1 ของประชากรทั่วประเทศ แต่กึ่งยังพบปัญหาในการจัดหาโลหิตพิเศษให้กับกลุ่มผู้ป่วยที่มีการสร้างแอนติบอดี เช่น ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และกลุ่มผู้ที่มีหมู่เลือดหายากชนิดพิเศษ¹ เช่น H(-), s(-), k(-), P(-), p phenotype, Jk(a-b-), Fy(a-b-), Di(b-), Rh17(D--), Rh Null และ RzRz เป็นต้น ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงจึงยังมีความสำคัญสำหรับการรักษาทางการแพทย์เป็นอย่างมาก

ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงได้จากการเตรียมส่วนประกอบโลหิตที่เป็นเม็ดเลือดแดงหรือมีเม็ดเลือดแดงปนอยู่เป็นจำนวนมาก มีหลายชนิดเช่น เม็ดเลือดแดงเข้มข้น (packed red cells; PRC) เม็ดเลือดแดงที่แยกเม็ดเลือดขาวออกโดยการปั่น (leukocyte poor packed red cells; LPRC) เม็ดเลือดแดงที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อย (leuko depleted packed red cells; LDPRC) โดยจะมีอายุการเก็บรักษาที่ 1-6 องศาเซลเซียสอยู่ที่ 35-42 วันหลังการเตรียม ขึ้นกับชนิดน้ำยารักษาสภาพเซลล์และความคงทนของส่วนประกอบโลหิตแต่ละชนิด² สำหรับเลือดหมู่พิเศษ หากไม่มีผู้ป่วยหมู่ตรงกันจำเป็นต้องใช้เลือด จึงไม่มีการขอเบิกจากโรงพยาบาล หากใกล้หมดอายุอาจพิจารณาให้ใช้กับผู้ป่วยรายอื่น แต่ถ้าไม่ได้ใช้ทำให้เลือดหมดอายุ จึงมีความจำเป็นในการนำกระบวนการแช่แข็งเม็ดเลือดแดงดังกล่าว (glycerolization) มาใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงหายากโดยเปลี่ยนเป็นเม็ดเลือดแดงแช่แข็ง (frozen red cells) ทำให้เก็บรักษาได้นานมากขึ้น และสามารถล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งให้กับผู้ป่วยได้ทันต่อการใช้งาน

กระบวนการแช่แข็ง (cryopreservation) นั้นใช้หลักการในการใช้สารประกอบเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์และป้องกันความเสียหายจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นกับเซลล์อันเกิดจากกระบวนการแช่แข็ง (cryoprotective agent) คือ glycerol ซึ่งเป็นสารประกอบที่เข้ากับน้ำได้ดีและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ หากได้รับเข้าไปในปริมาณเล็กน้อย การแช่แข็งเม็ดเลือดแดงด้วย glycerol ถูกนำมาใช้ในปี ค.ศ. 1950³ ด้วยความเข้มข้น 2 วิธี คือ การใช้ glycerol ความเข้มข้นต่ำ (low glycerol method) คือ glycerol 20% ในการแทนที่น้ำในเซลล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสภายใต้ไนโตรเจนเหลว และ การใช้ glycerol ความเข้มข้นสูง (high glycerol method) คือ glycerol 40% ในการแทนที่น้ำในเซลล์

และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส การใช้ความเข้มข้นของ glycerol ที่ต่างกันทั้งสองวิธี เมื่อนำเลือดออกมา ละลาย และล้างเอา glycerol ออกจะต้องมีความเข้มข้นของ glycerol น้อยกว่า 1% โดยองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) รับรองการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งชนิดที่ใช้ความเข้มข้นสูงที่ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเลือดได้ยาวนาน 10 ปี หลังผ่านกระบวนการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงแช่แข็ง (deglycerolization) จะต้องนำเลือดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หากเป็นการล้างแบบระบบเปิด จะต้องใช้เลือดภายใน 24 ชั่วโมง เนื่องจากอาจจะมีการปนเปื้อนเชื้อโรคได้ การแช่แข็งและล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งแบบระบบปิดด้วยเครื่องล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงอัตโนมัติจึงช่วยป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ และเพิ่มอายุการเก็บรักษาหลังการล้างได้นานขึ้น^{4,5}

เครื่องล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งอัตโนมัติ ACP215 Automated cell processor, Haemonetics, MA, USA สามารถทำการแช่แข็งเม็ดเลือดแดงและล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งร่วมกับชุดการแช่แข็งและชุดล้างที่มี filter ขนาด 0.22 ไมครอน (micron, μ) ในการกรองเชื้อแบคทีเรียออก มีระบบในการคำนวณสัดส่วนของน้ำยา glycerol ในการแช่แข็งและสัดส่วนของการใช้น้ำยาในการปั่นล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งตามค่าความเข้มข้นของเลือดและปริมาตรของเลือดโดยอัตโนมัติ และช่วยให้เลือดมีอายุหลังการปั่นล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งที่ 3-14 วัน ขึ้นอยู่กับน้ำยารักษาสภาพเซลล์

อย่างไรก็ตามการจ่ายผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งให้ผู้ป่วยจะต้องมีการควบคุมคุณภาพก่อนจ่ายให้ผู้ป่วยตามมาตรฐาน The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM, Council of Europe) และ Association for the Advancement of Blood & Biotherapies (AABB) โดยมีพารามิเตอร์ที่สำคัญดังนี้ 1) ค่า hematocrit (Hct) หลังการล้าง ต้องมีค่า 35-70%⁹ 2) ค่า osmolality จะต้องมีย่าน้อยกว่า 400 mOsm/L เทียบเท่ากับว่ามี glycerol น้อยกว่า 1 g%^{4,5,8,9} 3) ค่า hemolysis ในผลิตภัณฑ์ deglycerolized red cells ต้องมีค่าต่ำกว่า 3% hemolysis^{4,5,8,9} 4) เป็นผลิตภัณฑ์ ปราศจากเชื้อ โดยผ่านการตรวจ sterility testing¹⁰

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบประสิทธิภาพของการแช่แข็งและการล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งด้วยเครื่องล้างเม็ดเลือดแดงอัตโนมัติ ACP215 Automated Cell Processor ณ งานห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดแดง ศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงจากผู้บริจาคสุขภาพดีที่ผ่านเกณฑ์คัดกรองผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย และผ่านการตรวจคัดกรองไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสबी ซีฟิลิซิส และไวรัสเอชไอวี มีอายุเลือดหลังการเจาะเก็บไม่เกิน 7 วัน ต้องมีค่า Hct $75 \pm 5\%$ หากค่า Hct ไม่อยู่ในเกณฑ์ให้นำเลือดไปปั่นที่ความเร็วรอบ $1,615 \times g$ 4 นาที อุณหภูมิ 22°C องศาเซลเซียส low break เพื่อลดปริมาณของ additive solution แล้ววัดค่า Hct ให้ได้ตามเกณฑ์ จำนวน 14 ยูนิต และเลือดทั้ง 14 ยูนิตนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งและเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80°C องศาเซลเซียสมานานกว่า 1 สัปดาห์

วิธีการศึกษา

การแช่แข็งเม็ดเลือดแดง (glycerolization) ของผู้บริจาคโลหิต ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ACP215 Automated Cell Processor

นำถุงเลือดมารูดสายให้เลือดเข้าไปในถุงจากนั้นผสมเลือดในถุง ขึ้น-ลง ปล่อยให้เลือดไหลกลับไปที่ปลายสายถุงโลหิตด้วยแรง g ประมาณ 8-10 ครั้ง ทำซ้ำ 3 รอบ และ seal สายเพื่อนำมาทดสอบ Hct อีกครั้ง ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ Sysmex XN-1000™ Hematology Analyzer (Sysmex, Tokyo, Japan) หากค่า Hct ไม่ถึง $75 \pm 5\%$ ให้นำผลิตภัณฑ์เลือดไปปั่น ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงโลหิต centrifuge cryofuge 16 Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) ที่ฝ่ายผลิตส่วนประกอบโลหิต ด้วยความเร็วรอบ $1,615 \times g$ เป็นเวลา 4 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C องศาเซลเซียส บีบเอา additive solution ออกและทำการรูดสายถุง mix ขึ้น-ลงแล้วทำการ seal สายถุงบรรจุโลหิต นำไปวัดค่า Hct ให้ได้ตามเกณฑ์ จากนั้นนำถุงเลือดเชื่อมและถ่ายเลือดเข้า transfer bag 1,000 mL (Terumo, Tokyo, JAPAN) สำหรับแช่แข็ง ชั่งน้ำหนักเลือด และตั้งถุงเลือดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($20-24^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้อุณหภูมิของเลือดและ glycerol มีความใกล้เคียงกัน จากนั้นเชื่อมถุงเลือดกับ glycerolization disposable set ติดตั้งเข้ากับเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor ใส่ค่า Hct และปริมาตรเลือดลงในเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor นำผ้าก๊อชเช็ดฝาขวด glycerol 57.1% W/V และใช้ spike ของ set ต่อเข้ากับขวด glycerol 57.1% W/V เครื่อง ACP215 Automated Cell Processor จะคำนวณปริมาณของ glycerol ที่จะเติมใส่ไปในถุงเลือดอัตโนมัติ เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการเติม glycerol ในถุงเลือดจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 40% glycerol จากนั้นนำถุงเลือดไปปั่นตก

centrifuge cryofuge 16 Heraeus ด้วยความเร็วรอบ $1,248 \times g$ ที่อุณหภูมิ 22°C องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที บีบ supernatant glycerol ออก mix ถุงเลือดและ seal สายถุงบรรจุโลหิต นำไปวัดค่า Hct ซึ่งจะต้องมีค่า Hct ประมาณ $60 \pm 5\%$ นำถุงเลือดใส่ตลับคาสเซตและนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง -80°C องศาเซลเซียส ตลอดกระบวนการแช่แข็งตั้งแต่นำเลือดออกมาจากตู้เย็น 4°C องศาเซลเซียสจนเสร็จสิ้นกระบวนการและนำเข้าตู้แช่แข็ง -80°C องศาเซลเซียส¹⁰ จะต้องใช้ระยะเวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 1

การล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็ง (deglycerolization) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ACP215 Automated Cell Processor

นำเลือดที่แช่แข็ง 14 ยูนิต นานกว่า 1 สัปดาห์ไปละลายด้วย water bath ที่อุณหภูมิ $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส นาน 45 นาที วัดอุณหภูมิเลือดให้ได้ $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส หากเลือดยังไม่ได้อุณหภูมิดังกล่าวให้นำไปอุ่นต่อ 5 นาที และวัดอุณหภูมิเลือดอีกครั้ง

นำถุงเลือดเชื่อมกับ deglycerolization disposable set และติดตั้งเข้ากับเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor ใส่ค่า Hct และน้ำหนักเลือด และเชื่อมสายล้างเข้ากับ set กด start เครื่องจะปล่อย 12% NaCl เข้าไปในถุงเลือด 50 mL ซึ่ง 12% NaCl มีคุณสมบัติเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง (hypertonic) กว่าสารละลายที่อยู่ในเซลล์ 12% NaCl จะเข้าไปแทนที่ glycerol ในเซลล์ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นเครื่องจะทำการปั่นล้างจำนวน 5 รอบ ด้วยน้ำยา BIO-WASH solution glucose 0.25% NaCl 0.9% 60 mL, 70 mL, 100 mL, 250 mL และ 450 mL ตามลำดับ เมื่อบั่นล้างครบ 5 รอบ เครื่องจะเติมน้ำยารักษาสภาพเซลล์ 240 mL เพื่อใช้รักษาสภาพเซลล์หลังการล้าง โดยที่ น้ำยา SAG-M solution จะทำให้ผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงมีอายุได้นาน 72 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาตั้งแต่นำผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งออกจากตู้แช่แข็ง -80°C องศาเซลเซียสจนเสร็จสิ้นกระบวนการล้างและนำเข้าตู้เย็น 4°C องศาเซลเซียส¹² ต้องใช้ระยะเวลาในการล้างไม่เกิน 2 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 2

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจคุณภาพ³⁻¹¹ ที่ฝ่ายประกันและควบคุมคุณภาพ สำหรับตรวจค่า Hct ด้วยเครื่อง Sysmex XN-1000™ Hematology Analyzer ตรวจค่า hemolysis ด้วย The HemoCue® Plasma/Low Hb System (HemoCue, Ängelholm, Sweden) ตรวจค่า osmolality ด้วยเครื่อง Advanced® Model 2020 Multi-Sample Osmometer (Advanced Instruments, MA, USA) และตรวจ sterility test ด้วย The BACTEC™ FX (Becton Dickinson, NJ, USA) โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดสอบดังนี้

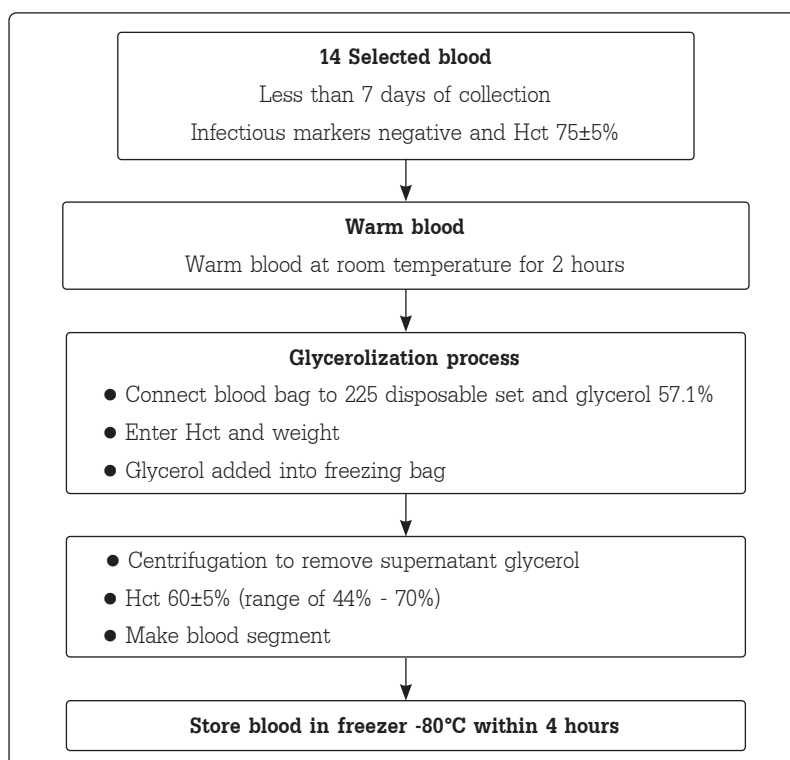


Figure 1 Flow diagram of glycerolization of red blood cells in a closed system using ACP215 Automated Cell Processor

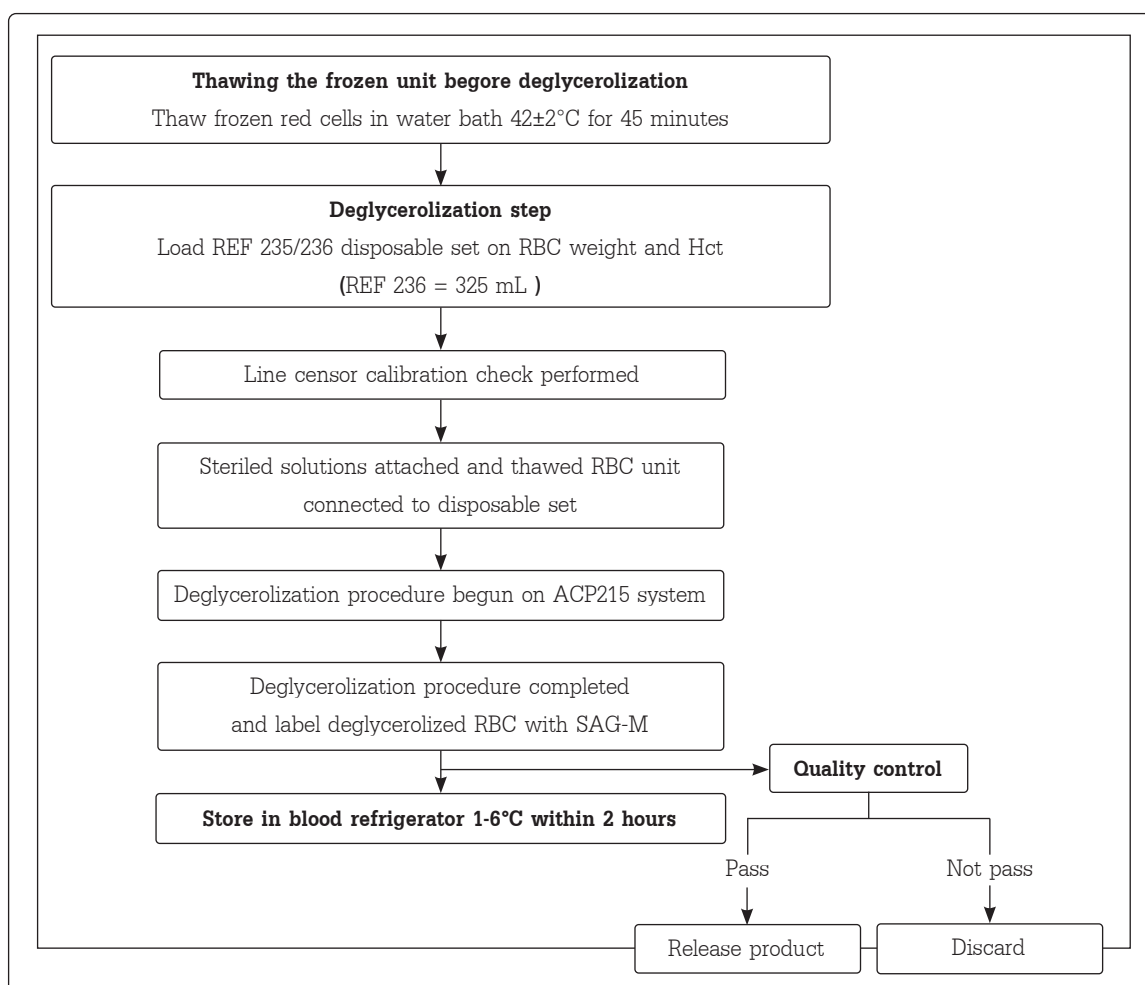


Figure 2 Flow diagram of deglycerolization of frozen red cells in a closed system using ACP215 Automated Cell Processor

ชุดที่ 1 ส่งถุงเลือดแช่แข็งที่ล้างเสร็จให้ฝ่ายประกันและควบคุมคุณภาพจำนวน 10 ยูนิต ตรวจหาค่า Hct, hemolysis, osmolarity ตรวจใน วันที่ 0 วันที่ 3 และ วันที่ 5 และการตรวจ sterility testing ใน วันที่ 0 และ วันที่ 5

ชุดที่ 2 แบ่งตัวอย่างใส่ transfer bag 30 mL 1 ถุง สำหรับส่งตรวจ Hct, hemolysis, osmolarity และ transfer bag 25 mL 1 ถุง สำหรับส่งตรวจ sterility test โดยส่งตรวจ 4 วัน ได้แก่ วันที่ 1 วันที่ 2 วันที่ 3 และ วันที่ 4

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลค่า Hct ก่อนและหลังการเติม glycerol คำนวณหักของเลือดก่อนการเติม glycerol และน้ำหนักเลือดหลังการล้าง และผลการควบคุมคุณภาพหลังการล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงแช่แข็งจากฝ่ายประกันและควบคุมคุณภาพ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้แก่ ค่า Hct ค่า osmolarity และค่า hemolysis มาคำนวณหาค่ามากที่สุด ค่าน้อยสุด ค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2019 (Microsoft, WA, USA) และนำผลการควบคุมคุณภาพเปรียบเทียบกับเกณฑ์อ้างอิงมาตรฐาน EDQM และ AABB ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ก่อนการจ่ายเลือดแต่ละยูนิตให้ผู้ป่วย

ผลการศึกษา

ข้อมูลต่างๆ ของผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 14 ยูนิต ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้วไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์จนถึงแช่แข็งมานานถึง 6 ปี ที่นำมาศึกษาได้แสดงใน Table 1 ประกอบด้วย ปริมาตรเฉลี่ยของเลือดก่อนการนำไปแช่แข็งอยู่ที่ 244.7 mL มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 74.2% และหลังจากการปั่นบีบ supernatant glycerol ออกมีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 63.5% โดยมีการส่งผลิตภัณฑ์หลังการล้างให้ฝ่ายประกันและควบคุมคุณภาพจำนวน 14 ยูนิต พบว่า ถุงเลือดมีปริมาตรเฉลี่ยหลังการล้างและเติมน้ำยารักษาสภาพเซลล์อยู่ที่ 331.7 mL

ผลการทดสอบคุณภาพหลังการล้างวันที่ 0 มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 47.6% ค่า hemolysis เฉลี่ยอยู่ที่ 0.20% ค่า osmolarity เฉลี่ยอยู่ที่ 367.4 mOsm/L และปราศจากเชื้อทั้งหมด ผลวันที่ 1 มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 45.1% ค่า hemolysis เฉลี่ยอยู่ที่ 0.30% ค่า osmolarity เฉลี่ยอยู่ที่ 344.5 mOsm/L และปราศจากเชื้อทั้งหมด ผลวันที่ 2 มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 46.0% ค่า hemolysis เฉลี่ยอยู่ที่ 0.4% ค่า osmolarity เฉลี่ยอยู่ที่ 345.5 mOsm/L และปราศจากเชื้อทั้งหมด ผลวันที่ 3 มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 47.1% ค่า hemolysis อยู่ที่ 0.4% ค่า osmolarity อยู่ที่ 361.5 mOsm/L และปราศจากเชื้อทั้งหมด ผลวันที่ 4 มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 45.1% ค่า hemolysis เฉลี่ยอยู่ที่ 0.6% ค่า osmolarity เฉลี่ย

อยู่ที่ 345.3 mOsm/L และปราศจากเชื้อทั้งหมด และผลวันที่ 5 มีค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 47.5% ค่า hemolysis เฉลี่ยอยู่ที่ 0.40% ค่า osmolarity เฉลี่ยอยู่ที่ 360.6 mOsm/L ซึ่งพบว่าความเข้มข้นเลือดตั้งต้นเฉลี่ยอยู่ที่ 74.2% และความเข้มข้นเลือดหลังการล้างเฉลี่ยอยู่ที่ 47.5% มีการสูญเสียความเข้มข้นของเลือดหายไประหว่างกระบวนการแช่แข็งและกระบวนการล้างเซลล์แช่แข็งประมาณ 26.7% รายละเอียดดังแสดงใน Table 2

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่า เครื่อง ACP215 Automated Cell Processor, Haemonetics สามารถใช้แช่แข็งเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตเพื่อเก็บรักษาคุณภาพที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 ปี การนำเลือดมาแช่แข็งนั้นขึ้นอยู่กับนโยบายของแต่ละองค์กร เช่น การแช่แข็งหมู่เลือดหายากชนิดพิเศษ เพื่อนำไปใช้ในสถานการณ์ฉุกเฉินที่ผู้ป่วยต้องใช้เลือดเร่งด่วน หรือการแช่แข็งเลือดที่บริจาคเพื่อตนเอง (autologous transfusion) หรือหน่วยงานแพทย์ทหารบางประเทศได้นำกระบวนการดังกล่าวมาช่วยในการแช่แข็งเลือดเก็บไว้เพื่อนำไปใช้ในการรักษาทหาร เป็นต้น¹⁴⁻¹⁶

ปัจจุบันศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติมีการแช่แข็งเก็บรักษาเลือดหายากชนิดพิเศษ¹⁶ ได้แก่ H(-), s(-), k(-), P(-), p phenotype, Jk(a-b-), Fy(a-b-), Di(b-), Rh17(D--), Rh Null และ RzRz เป็นต้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึงปัจจุบัน มีจำนวนเลือดแช่แข็งมากกว่า 80 ยูนิต นอกจากการแช่แข็งดังกล่าวแล้วศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์และภาคบริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้ริเริ่มโครงการพัฒนาการผลิตเซลล์มาตรฐานลักษณะเฉพาะ (highly selected) สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดทั่วประเทศในการตรวจหาแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิต จำนวน 500,000 ราย เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเซลล์มาตรฐาน และเป็นการตรวจหาผู้บริจาคโลหิตที่มีหมู่ชนิดพิเศษ เพื่อดูติดตามมาบริจาคโลหิตและแช่แข็งเก็บไว้ให้ผู้ป่วยได้ในอนาคต

นอกจากการแช่แข็งเลือดแล้ว การล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งสามารถทำได้ทั้งแบบ manual¹⁵ ที่เป็นระบบเปิด เมื่อล้างเซลล์เสร็จแล้วจะต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง เพราะผู้ป่วยอาจจะได้รับเลือดที่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและเกิดภาวะติดเชื้อตามมาได้ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะยังไม่มีการรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากการรับเลือดที่เตรียมด้วยวิธี manual แต่มีการศึกษาในปี ค.ศ. 2000 ของ Valeri ได้ทดสอบการแช่แข็ง 3 วิธี 1) วิธี Cohn method แช่แข็งด้วย glycerol เข้มข้น 40% W/V เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 31-37 ปี จำนวน 15 ยูนิต 2) วิธี Huggins

Table 1 Product details of glycerolized and deglycerolized red cells

No.	Product	Blood gr.	Time storage at -80 °C (years)	Time-glyc (hrs)	Time-deglyc (hrs)	Product pre-glyc, Hct (%) SOP(ACP215) 75±5%	Product pre-glyc, volume (mL) SOP(ACP215) > 185	Product post-glyc, Hct (%) SOP(ACP215) 60±5%	Product post-deglyc, volume (mL) EDQM 20 th ed. > 185	Product post-deglyc, day 0 Hct (%) EDQM 20 th ed. 35-70%
1	PRC	O +	3.3	3.8	1.7	75.1	250.4	60.4	325.0	43.1
2	PRC	O +	3.4	3.9	1.8	77.9	268.6	57.4	319.0	51.1
3	PRC	O +	4.4	3.7	1.7	79.1	269.4	58.5	319.0	54.5
4	PRC	O +	5.75	3.7	1.9	74.8	274.9	59.8	274.0	48.3
5	PRC	O +	0.12	3.9	1.9	71.8	262.0	64.0	317.0	44.9
6	PRC	O +	0.08	3.9	2.0	76.2	237.1	67.1	387.0	46.9
7	PRC	O +	0.08	3.7	1.8	76.3	230.4	65.7	338	41.5
8	PRC	O +	0.08	3.8	1.8	71.4	245.0	60.7	340.4	49
9	PRC	O +	0.08	3.8	1.7	70.0	260.7	57.0	334.5	47.6
10	PRC	O +	0.08	3.9	1.9	73.2	259.8	61.3	344.1	49.1
11	PRC	O +	0.08	4.0	1.9	73.7	229.5	68.3	338.5	54.7
12	PRC	O +	0.02	3.8	1.7	70.3	224.9	63.1	342.7	43.2
13	LPRC	O +	0.02	3.9	1.8	74.8	200.02	66.9	331.0	42.8
14	LPRC	O +	0.02	3.9	1.8	74.5	213.1	64.7	333.0	39.7
	MAX		5.75	4.0	2.0	79.1	274.9	68.3	387.0	54.7
	MIN		0.02	3.7	1.7	70.0	200.02	57.0	274.0	39.7
	Average		1.25	3.8	1.8	74.2	244.7	63.5	331.7	46.9

glyc = glycerolization; deglyc = deglycerolization

Table 2 Quality control results of glycerolized and deglycerolized red cells

	Quality control results of deglycerolized red cells					
	Day 0 (N = 10)	Day 1 (N = 4)	Day 2 (N = 4)	Day 3 (N = 14)	Day 4 (N = 4)	Day 5 (N = 10)
Product post-deglyc, Hct (%)						
Max, min	54.5, 41.5	54.7, 39.7	54.8, 38.1	55.1, 38.2	55.1, 37.9	54.7, 40.8
Average	47.6	45.1	46.0	47.1	45.1	47.5
EDQM 20 th ed. 35-70% (pass/fail)	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Osmolarity (mOsm/kg)						
Max, min	386, 348	352, 342	353, 342	385, 342	353, 342	371, 348
Average	367.4	344.5	345.5	361.5	345.3	360.6
AABB 20 th ed. < 400 (pass/fail)	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Hemolysis (%)						
Max, min	0.38, 0.11	0.37, 0.24	0.45, 0.33	0.62, 0.22	0.98, 0.39	0.68, 0.34
Average	0.20	0.30	0.40	0.40	0.60	0.40
AABB 20 th ed. < 3 (pass/fail)	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
Sterility	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Not tested
EDQM 20 th ed. sterile (pass/fail)	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	

method แช่แข็งด้วย glycerol เข้มข้น 45% W/V เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 22-32 ปี จำนวน 12 ยูนิต และ 3) วิธี NBRL method แช่แข็งด้วย glycerol เข้มข้น 40% W/V เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 10-17 ปี จำนวน 32 ยูนิต ทั้ง 3 วิธี ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อหลังการล้าง¹² แต่อย่างไรก็ตามยังมีความเสี่ยงที่ผู้ป่วยจะได้รับการปนเปื้อนเชื้อจากการรับเลือดที่ผ่านขั้นตอนการล้างด้วยวิธี open system

การใช้เครื่อง ACP215 Automated Cell Processor¹² จึงเป็นเครื่องมือที่ช่วยลดความเสี่ยงและปัญหาดังกล่าว เนื่องจากการล้างในระบบปิด มีวิธีการและขั้นตอนไม่ยุ่งยากในการใช้งานเครื่องมือชุดกรองแบบที่เรียกว่าในชุดล้าง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำข้อมูลการทดสอบความปราศจากเชื้อในผลิตภัณฑ์หลังการล้างมาศึกษาเป็นการพัฒนากระบวนการและปลดล็อคเงื่อนไขการปล่อยผลิตภัณฑ์ โดยเมื่อล้างเสร็จแล้วอาจจะจ่ายให้กับโรงพยาบาลต่างๆ โดยไม่ต้องรอผลการทดสอบ bacterial culture ซึ่งจะช่วยให้ระยะเวลาในการใช้เลือด นอกจากนี้จากการศึกษาผลการควบคุมคุณภาพต่างๆ พบว่า ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่ระบุไว้ อาทิ เช่น ค่า osmolarity ที่เป็นดัชนีชี้วัดที่บ่งบอกความเข้มข้นของ glycerol ที่อยู่ในถุงเลือดหลังการล้าง ซึ่ง glycerol เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิปิด หากมีปริมาณ glycerol ตกค้างในผลิตภัณฑ์มากกว่า 1 g% glycerol อาจส่งผลให้เกิดไขมันอุดตันได้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหัวใจ หรือผู้ป่วยโรค

หลอดเลือดสมองและระบบประสาท นอกจากนั้นแล้วยังยืดระยะเวลาในการเก็บเลือดหลังการล้างได้จากการใช้น้ำยารักษาสภาพเซลล์ถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งยืดระยะเวลาทำให้สามารถขนส่งเลือดไปยังโรงพยาบาลต่างจังหวัดได้

การศึกษาในประเทศอินเดียของ Col Alok Sen และ Khetarpal A ปี ค.ศ. 2013 ได้ทำการศึกษาการแช่แข็งและล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งให้กับผู้ป่วยด้วยเครื่อง ACP215 Automated Cell Processor¹² ในปี ค.ศ. 2007 ถึงปี ค.ศ. 2009 ทั้งหมด 99 ยูนิต พบผลการทดสอบคุณภาพหลังการล้างในวันที่ 0 ดังนี้ ค่า Hct เฉลี่ยอยู่ที่ 47.13% ค่า hemolysis เฉลี่ยอยู่ที่ 0.18% ค่า osmolarity เฉลี่ยอยู่ที่ 323.27 mOsm/L และปราศจากเชื้อทั้งหมด¹⁴ อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า การศึกษาของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติและการศึกษาในประเทศอินเดียพบว่า ค่า Hct ของถุงเลือดจะสูญหายไประหว่างกระบวนการแช่แข็งและกระบวนการล้างเซลล์แช่แข็งประมาณ 30-40% จากค่า Hct ตั้งต้น ของ fresh blood ดังนั้นการใช้ deglycerolized red cells จึงเหมาะสมกับการให้ผู้ป่วยที่ต้องการใช้เลือดระหว่างผ่าตัดมากกว่าการให้เพื่อใช้ในการรักษาภาวะช็อค เนื่องจากมีปริมาณ Hct จำนวนไม่มาก ในขณะที่เดียวกับการใช้เครื่องจะมีค่าใช้จ่ายในการแช่แข็งและการล้างค่อนข้างสูง นอกจากนี้แล้วธนาคารเลือดจะต้องทำการทดสอบความเข้ากันได้ระหว่างผู้ป่วยกับ frozen red cells ก่อนการล้าง เนื่องจากจะไม่สามารถนำเลือดที่ล้างนำกลับไปแช่แข็งใหม่ได้อีกครั้ง

สรุป

การศึกษานี้พบว่า เครื่อง ACP215 Automated Cell Processor, Haemonetics สามารถใช้แช่แข็งเม็ดเลือดแดง และใช้ล้างเม็ดเลือดแดงแช่แข็งได้ ผลการทดสอบคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานสามารถนำไปให้ผู้ป่วยได้ และยังใช้เก็บรักษาเลือดหายาก เพื่อให้ผู้ป่วยที่มีเลือดหายากไว้นับสนุนการจัดหาเลือดในกรณีที่ไม่สามารถติดตามผู้บริจาคโลหิตกลุ่มเหล่านี้มาให้ผู้ป่วยได้ทันที นอกจากนั้นยังยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาเลือดตามชนิดของน้ำยารักษาสภาพเซลล์หลังการล้างเนื่องจากเป็นระบบปิด ทำให้สามารถขนส่งเลือดที่ล้างแล้วไปให้ผู้ป่วยได้ทั่วประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร์ ผู้เชี่ยวชาญพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย นางศิริลักษณ์ เพียรเจริญ หัวหน้าศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้คำแนะนำในการเขียนต้นฉบับ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายประกันและควบคุมคุณภาพ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังการล้างด้วยเครื่องอัตโนมัติ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานห้องปฏิบัติการเม็ดเลือดแดง ศูนย์ห้องปฏิบัติการอ้างอิง ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เม็ดเลือดแดงในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Anastasiadi AT, Tzounakas VL, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Seghatchian J, Antonelou MH. When I need you most: frozen red blood cell for transfusion. *Transfus Apher Sci.* 2020;59:102786. doi: 10.1016/j.transci.2020.102786.
- National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Standards for blood bank and transfusion services. 4th ed. Bangkok: National Blood Centre; 2015. p. 14-6.
- Smith AU. Prevention of hemolysis during freezing and thawing of red blood cells. *Lancet.* 1950;2:910. doi: 10.1016/s0140-6736(50)91861-7.
- Krijnen HW, de Wit JJ, Kuivenhoven AC, Loos JA, Prins HK. Glycerol treated human red cells frozen with liquid nitrogen. *Vox Sang.* 1964;9:559-72.
- Eades B. Freezing and recovering rare red blood cells using glycerol. *Immunohematology.* 2020;36:85-8.
- Henkelman S, Noorman F, Badloe JF, Lagerberg JW. Utilization and quality of cryopreserved red blood cells in transfusion medicine. *Vox Sang.* 2015;108:103-12.
- Chaudhari CN. Frozen red blood cell in transfusion. *Med J Armed Forces India.* 2009;65:55-8.
- Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM. Technical manual. 20th ed. Bethesda, MA: American Association of Blood Banks; 2020.
- American Association of Blood Banks. Technical manual. 20th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2020.
- Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 20th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2020. p. 217-9.
- Turner T, Hansen A, Kurach J, Acker JP. From development to implementation: adjusting the hematocrit of deglycerolized red cell concentrates to meet regulatory standards. *Transfus Med Hemother.* 2017;44:30-8.
- Verleri CR, Ragno G, Pivacek LE, Cassidy GP, Srey R, Hansson-Wicher M, et al. An experiment with glycerol frozen red blood cells stored at -80°C for up to 37 years. *Vox Sang.* 2000;79:168-74.
- Myhre BA, Marcus CS. The extension of 4°C storage time of frozen-thawed red cells. *Transfusion.* 1992;32:344-8.
- Sen A, Khetarpal A. Comparative study of automated cryopreservation of red blood cells. *Med J Armed Forces India.* 2013;69:345-50.
- Valeri CR, Ragno G. Cryopreservation of human blood products. *Transfus Apher Sci.* 2006;34:271-87.
- Meryman HT, Hornblower M. A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration. *Transfusion.* 1972;12:145-55.

