

## บทความพิเศษ

# การทดสอบและเตรียมเลือดให้ผู้ป่วยเด็กและทารก

ลัดดา ฟองสถิตย์กุล

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การเตรียมเลือดให้ผู้ป่วยเด็กและทารก เป็นหนึ่งในกระบวนการคุณภาพที่ผู้เกี่ยวข้องมักจะถามถึงอยู่เสมอ แต่เนื่องจากการปฏิบัติที่หลากหลายแตกต่างกันไปในแต่ละสถาบัน ทำให้ดูเหมือนว่า ไม่มีกฎระเบียบข้อบังคับหรือมาตรฐานที่ชัดเจน ดังนั้นจุดประสงค์ของบทความนี้ ต้องการทบทวนความรู้ วิธีการเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยเด็ก วิธีทดสอบพิเศษต่างๆ และแนวปฏิบัติตามมาตรฐานนโยบายใหม่ๆ ของการเตรียมเลือดในเด็ก ทั้ง 4 ลักษณะ ได้แก่

1. การเตรียมเลือดแบบ small volume replacement ใน neonate อายุต่ำกว่า 4 เดือน
2. การเตรียมเลือดสำหรับ exchange transfusion หรือ intrauterine transfusion ในผู้ป่วย hemolytic disease of the newborn (HDN)
3. การเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย
4. การเตรียมเลือดให้เด็กทั่วไปอายุมากกว่า 4 เดือน หรือกรณีฉุกเฉิน

ในปัจจุบันพบว่าร้อยละ 30 ของเลือดที่จัดหาได้ ถูกเตรียมให้กับผู้ป่วยเด็ก ซึ่งจากสถิติของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย พบว่าร้อยละ 20 ได้ให้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การเตรียมเลือดในผู้ป่วยเด็กทั้ง 4 ลักษณะ มีวิธีการวินิจฉัยและเตรียมเลือดแตกต่างกัน เทคนิคในการเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยในแต่ละกลุ่ม สะท้อนถึงคุณภาพและมาตรฐานของแต่ละห้องปฏิบัติการ ว่าสามารถให้บริการผู้ป่วยเด็กและทารก ได้อย่างถูกต้องรวดเร็วเพียงใด การให้เลือดในเด็กเล็กนั้น มีลักษณะแตกต่างจากผู้ใหญ่ จึงควรเพิ่มความระมัดระวังมากขึ้น เพราะเด็กตัวเล็กมาก มีปริมาณเลือดในตัวน้อย หากเกิดความล่าช้าจะมีการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วและรุนแรงกว่าผู้ใหญ่ เด็กไม่สามารถทนต่อภาวะการขาดออกซิเจนได้นาน เกิดภาวะหัวใจวาย หรือ สมองถูกทำลาย จาก bilirubin ที่มีระดับสูงในเลือด ทำให้เกิดภาวะ kernicterus ซึ่งทำให้ทารกพิการอย่าง

ถาวร หากไม่ได้รับการรักษาให้ถูกต้องทันการ ดังนั้นการให้เลือดจึงมีผลดีต่อการรักษา ทั้งเป็นการช่วยชีวิตและป้องกันความพิการ

การเจริญเติบโตของทารกนั้นเริ่มจาก embryo เจริญเป็น fetus ในครรภ์มารดา เมื่อคลอดจนถึงอายุ 4 เดือน เรียกว่า neonate แล้วเติบโตเป็น infant และ child ในที่สุด การเปลี่ยนแปลงของเด็กหลังคลอด ต้องทนต่อภาวะกดดันหลายประการ เช่น อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงกะทันหันเมื่อคลอด ในทารกปกติเมื่อเริ่มหายใจ กระบวนการสร้างเม็ดเลือดลดลงทันที HbF จะถูกเปลี่ยนเป็น HbA และเมื่อทารกอายุ 1 เดือน HbF ลดลง เหลือ 50-75% เมื่ออายุ 6 เดือน HbF ลดลง เหลือ 5-8% และเมื่ออายุ 1 ปี HbF ลดลง เหลือน้อยกว่า 1% หลังคลอดจนถึงอายุ 4 เดือน ฮีโมโกลบินจะค่อยๆ ลดลงจาก 18 ก./ดล. เป็น 11 ก./ดล. เด็กคลอดก่อนกำหนดจะทนต่อภาวะกดดันต่างๆ ได้น้อยกว่าเด็กปกติ ทำให้ต้องเติมเลือดเพื่อไม่ให้เกิดภาวะ tissue hypoxia อย่างไรก็ดีตาม ความก้าวหน้าในการดูแลเด็กที่ตัวเล็ก น้ำหนักตัวน้อย พัฒนาขึ้นเรื่อยๆ ตามแนวปฏิบัติและมาตรฐาน การเติมเลือดในปัจจุบันจึงมีแนวโน้มลดลง ยกเว้นผู้ป่วยโลหิตจางธาลัสซีเมีย

## 1. การเตรียมเลือดแบบ small volume replacement ใน neonate อายุต่ำกว่า 4 เดือน<sup>1,2</sup>

การให้เลือดแก่ทารกแรกคลอดที่มีภาวะซีดนั้นแม้ว่าจะมีผลดี แต่หากมีความจำเป็นต้องให้หลายครั้ง ทุกครั้งที่เจาะเลือดทารกต้องเจ็บปวดและสูญเสียเลือดจำนวนหนึ่ง ที่ใช้ไปในการทดสอบความเข้ากันได้ของเลือด (cross-matching) จึงได้มีข้อเสนอแนะให้หลีกเลี่ยงการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดทารก<sup>1</sup> และเนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันในทารกแรกคลอดยังไม่สมบูรณ์ ตอบสนองต่อแอนติเจนได้น้อยมาก ดังนั้นผู้ป่วยเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 4 เดือนตลอดช่วงที่มาเข้าอยู่ในโรงพยาบาลแต่ละครั้ง (one admission) เมื่อต้องการเติมเลือดจึงไม่ต้องผ่านกระบวนการทำ cross-matching แต่ต้องระวังเป็นพิเศษในการตรวจกรอง unexpected antibody ทั้งของตัวผู้ป่วยเองและมารดา รวมทั้งผล direct antiglobulin test ของทารกประกอบการวินิจฉัยตัดสินใจในการเตรียมเลือดโดยมีขั้นตอน ดังนี้

ได้รับต้นฉบับ 26 กุมภาพันธ์ 2553 ให้ลงตีพิมพ์ 16 มีนาคม 2553

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ คุณลัดดา ฟองสถิตย์กุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

## ขั้นตอนการปฏิบัติ

1. เจาะเลือดผู้ป่วยทารกแรกคลอด 0.5-1 มล. พร้อมเลือดมารดา 6-7 มล. ภายในได้เดือนไขทารก ต้องมีอายุไม่เกิน 4 เดือน ตลอดช่วงที่เข้าอยู่ในโรงพยาบาลแต่ละครั้ง
2. ตรวจ ABO, Rh, Direct antiglobulin test (DAT) ของทารก เฉพาะครั้งแรกที่ขอเลือด ไม่จำเป็นต้องทำซ้ำ ตลอดช่วงการเข้าอยู่ในโรงพยาบาลครั้งนั้น
3. ตรวจ ABO, Rh ของมารดา
4. ตรวจซีรัมของมารดา และ/หรือทารก เพื่อหา unexpected antibodies ต่อ red blood cells (RBC) antigens ระบบต่างๆ ด้วยการทำ antibody screening test ซึ่งถ้าให้ผลบวกให้ทำ antibody identification ต่อ
5. ถ้าผลการตรวจหา unexpected antibodies ให้ผลเป็นลบ ไม่จำเป็นต้องทำ compatibility test หรือ crossmatch ระหว่างเลือดทารกกับเลือดของผู้บริจาค
6. ก่อนเตรียมเลือด ทำการตรวจสอบอายุของผู้ป่วยก่อน ผู้ป่วยต้องมีอายุไม่เกิน 4 เดือน และทำการตรวจสอบผล DAT, Indirect antiglobulin test (IAT) และ antibody screening ต้องเป็นไปตามเงื่อนไข คือให้ผลเป็นลบหมดทุกกรณี
7. กรณีผู้ป่วยมีอายุเกิน 4 เดือน หรือผลการทดสอบ antibody screening ให้ผลบวก และทราบชนิดของแอนติบอดี ต้องเปลี่ยนไปทำ complete crossmatch กับเลือดที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดี แทน และต้องให้ผลลบจึงจะใช้เลือดนั้นได้
8. เตรียมเลือดชนิด leukodepleted red cells (LDRBC) group O โดยใช้วิธีปั่นแยกด้วย refrigerated centrifuge หรือวิธีการกรองด้วยชุดกรองเม็ดเลือดขาว (leukocyte filter)
9. แบ่งเลือดเป็นถุงย่อย ใช้ multiple bag (Pedi packs) สำหรับเด็ก แบ่งด้วยระบบ closed system เป็นถุงละ 50-100 มล. ถ้าไม่มีถุงชุดสำหรับเด็ก สามารถแบ่งโดยใช้เครื่องเชื่อมสาย TSCD หรือ Compodox ซึ่งมีผลดีคือช่วยให้ทารกได้รับเลือดถุงเล็กได้หลายครั้ง จากเลือดผู้บริจาคเพียงรายเดียว ทำให้ลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อ และถูกกระตุ้นด้วยเลือดผู้บริจาคหลายคน หากแบ่งโดยไม่ใช้เครื่องเชื่อมสาย ถือว่าเป็น open system ต้องใช้เลือดนั้นภายใน 24 ชั่วโมง
10. กรณีที่แพทย์ประสงค์ใช้เลือด ABO compatible blood ที่ไม่ใช่หมู่ O ต้องทำการตรวจให้แน่ชัดก่อนว่าในซีรัมของทารกไม่มี maternal anti-A หรือ anti-B โดยทำ

crossmatch จนถึง antiglobulin phase ทุกครั้ง ถ้าหากพบว่ายังมีแอนติบอดีเหลืออยู่ ต้องเลือกใช้เม็ดเลือดแดงหมู่ที่ไม่มี A หรือ B แอนติเจน ที่ตรงกับแอนติบอดีที่ตรวจพบ จนกว่า anti-A หรือ anti-B จะหมดไป

## 2. การเตรียมเลือด exchange transfusion ในผู้ป่วย hemolytic disease of the newborn (HDN)<sup>1-6, 7</sup>

ภาวะที่เม็ดเลือดแดงแตกหรือมีอายุสั้นกว่าปกติในเด็กแรกเกิด ที่เกิดจากการที่มารดาและบุตรมีหมู่เลือดเข้ากันไม่ได้ โดยเฉพาะมารดาที่เป็นหมู่ O และมีบุตรที่มีหมู่เลือด A หรือ B เหมือนบิดา แอนติบอดีจำเพาะของมารดา ผ่านรกเข้าไปทำลายเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์ อาการมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอัตราการทำลายของเม็ดเลือดแดง รายรุนแรงอาจถึงตายได้ แต่ในรายที่รอดการทำลาย เม็ดเลือดแดงจะยังคงมีต่อไป จนกว่าแอนติบอดีในทารกที่ได้รับมาจากมารดาจะสลายไป แพทย์จำเป็นต้องเปลี่ยนถ่ายเลือดเพื่อป้องกันภาวะซีด และลดปริมาณสะสมของ unconjugated bilirubin เพื่อป้องกันภาวะ kernicterus ซึ่งอาจทำให้เด็กปัญญาอ่อนได้ ในรายที่รุนแรงแพทย์อาจจำเป็นต้องให้เลือดตั้งแต่เด็กอยู่ในครรภ์ (intrauterine transfusion) เพื่อให้ทารกมีชีวิตรอดจนถึงคลอด เด็กในครรภ์สามารถกำจัด bilirubin ออกผ่านทางสายสะดือสู่กระแสเลือดของแม่ จึงไม่เหลืออยู่ในครรภ์ เมื่อคลอดแล้ว ดัชนียังไม่สามารถกำจัดเองได้ ทำให้เหลือ ดัชนีความเหลืองขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณไตเตอร์ของแอนติบอดี และภาวะคลอดก่อนกำหนด

การเตรียมเลือดสำหรับ exchange transfusion นั้น มีข้อจำกัดซึ่งไม่เหมือนกับการเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยเด็กทั่วไป เช่นตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการตรวจสอบความเข้ากันได้ของเลือด ต้องใช้ทั้งเลือดแม่และเลือดลูก ทำการตรวจสอบทั้ง DAT และ IAT เพื่อหา unexpected antibody ตัวที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ส่วนหมู่เลือดของผู้บริจาคที่เตรียมให้ผู้ป่วย ต้องเข้ากันได้กับหมู่เลือดของแม่ซึ่งอาจเป็นคนละหมู่กับเลือดของลูก ลักษณะเลือดที่เตรียมต้องเป็น CMV negative หรือ เลือดกรอง leukodepleted red cells ที่มีอายุไม่เกิน 5 วัน ควรผ่านการฉายแสง เพื่อป้องกัน graft versus host disease (GVHD) เพราะภูมิคุ้มกันของทารกยังไม่สมบูรณ์ ส่วนพลาสมาที่ใช้ในการผสมต้องเป็น fresh frozen plasma (FFP) หมู่เลือดของพลาสมาควรเลือกใช้หมู่ AB ซึ่งสามารถใช้ได้ทุกหมู่ หรืออาจเป็นพลาสมาหมู่เดียวกับตัวเด็กเท่านั้น เช่น A หรือ B หรือ O ก็ได้ แต่ห้ามใช้ต่างหมู่ ทารกที่เกิดภาวะ HDN ในประเทศไทยพบได้ ทั้งที่เป็น ABO-HDN และ Rh-HDN แอนติบอดีที่เป็นปัญหาย่อยสุดนอกจาก ABO ได้แก่ anti-D ถัดมาคือ anti-c, anti-CD, anti-C +

anti-e, anti-c + anti-E ส่วนแอนติบอดีในระบบอื่นที่พบเป็นสาเหตุของ HDN ได้แก่ anti-K, anti-Fy<sup>a</sup> รายงานจาก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล<sup>9</sup> มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2547 พบ Rh-HDN จำนวน 40 ราย รักษาโดยทำ exchange transfusion เพียง 9 ราย ระบบ P พบ 12 ราย ระบบ MNS พบ 10 ราย ระบบ Kidd พบ anti-Jk<sup>b</sup> 9 ราย ภายใน 5 ปี แต่ทั้งหมดไม่ต้องทำ exchange transfusion อุบัติการณ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เคยพบ HDN ที่เกิดจาก anti-M จำนวน 1 ราย ส่วน anti-K พบได้น้อยมากในประเทศไทย

กลไกการกระตุ้นให้สร้าง anti-D และผลของการเข้ากันไม่ได้ในระบบ ABO ระหว่างแม่และทารกในครรภ์ ในระหว่างการตั้งครรภ์หรือขณะคลอด มีการฉีกขาด ของ placenta ทำให้เม็ดเลือดแดงของลูกบางส่วนเข้าสู่ตัวแม่ แล้วกระตุ้นให้แม่สร้างแอนติบอดี ถ้าแม่และลูกมี ABO incompatible เมื่อเม็ดเลือดแดงของลูกซึ่งเป็น A, Rh-positive หรือ B, Rh-positive เข้าไปในตัวแม่ซึ่งเป็นหมู่ O เม็ดเลือดแดงจะถูกทำลายด้วย anti-A หรือ anti-B ของแม่ จึงไม่สามารถไปกระตุ้นแม่ให้สร้าง anti-D แต่ในกรณีที่แม่และลูกมี ABO compatible กัน เช่น แม่เป็นหมู่ O ลูกเป็นหมู่ O เมื่อเลือดลูกเข้าไปในกระแสเลือดของแม่ ไม่ถูกทำลายโดย anti-A,B เม็ดเลือดแดงของลูกจึงมีโอกาสดำรงชีพอยู่ได้นานพอที่จะไปกระตุ้นแม่ให้สร้าง anti-D ได้ และ anti-D ชนิด IgG นี้ จะไปทำลายเม็ดเลือดแดงของลูกได้ในครรภ์ต่อไป ดังนั้น Rh-HDN จึงไม่เกิดในท้องแรก อย่างไรก็ตามการกระตุ้นผู้ป่วย Rh negative โดยการตั้งครรภ์หรือการได้รับเลือด Rh positive มีเพียงประมาณร้อยละ 50 เท่านั้นที่สร้าง anti-D ขึ้น การตั้งครรภ์ในครรภ์ที่ 2 นี้ หากแม่ยังไม่สร้าง anti-D น่าจะคาดเดาได้ว่า ในครรภ์ต่อไปก็อาจจะไม่สร้างเช่นเดียวกัน

## 2.1 ABO-HDN ส่วนใหญ่เกิดในทารกที่มีหมู่เลือด A หรือ

B และมารดาเป็นหมู่ O อาจเกิดได้ตั้งแต่ท้องแรก ผล DAT มักจะไม่แน่นอน พบว่า DAT ให้ผลบวกประมาณร้อยละ 50-60 ของรายที่มีอาการรุนแรงหรือปานกลาง และส่วนใหญ่จะให้ผลบวกค่อนข้างอ่อน ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความอ่อนของแอนติเจน A หรือ B ในทารกแรกเกิด ประกอบกับแอนติเจนจับหลวมๆ บนเม็ดเลือดแดงซึ่งหลุดได้ง่ายขณะล้างเม็ดเลือดตามวิธีการทำ DAT และการที่ทารกมี A substance หรือ B substance ในซีรัมทำให้มีการทำลายแอนติบอดีก่อนที่จะไปจับบนเม็ดเลือดแดงเป็นอีกเหตุผลหนึ่ง อย่างไรก็ตามการใช้ adult A-cells, B-cells ช่วยเพิ่ม sensitivity ของการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มากขึ้น และการทำ heat elution เพื่อตรวจยืนยันชนิดของแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนเม็ดเลือดแดงเทียบกับแอนติบอดีของมารดา จากสถิติพบว่าทารกที่มีอาการเหลืองจาก ABO-HDN มีประมาณ 1 ใน 150 ของทารกแรกเกิดทั้งหมด การทำ exchange transfusion ช่วยได้มากหากสามารถหาเลือดที่เข้ากันได้ทันภายในเวลาที่กำหนดก่อนเกิดภาวะ kernicterus การทำ cross-matching ต้องหาเลือดที่เข้ากันได้กับเลือดของมารดาดีกว่าเลือดของทารก จึงจำเป็นต้องส่งเลือดของมารดามาด้วยทุกครั้งที่ต้องการเลือด

ด้วยสาเหตุการทำลายเม็ดเลือดแดงของเด็กเกิดจาก anti-A หรือ anti-B ในมารดาที่ไปจับกับหมู่เลือด A หรือ B ของเด็ก ดังนั้นควรเลือกเลือดที่ให้เข้าไปในเด็กแล้วจะไม่ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของเด็ก อันดับแรกหลายท่านอาจพิจารณาหมู่เลือด O-low titer แต่เนื่องจากเป็นเรื่องยุ่งยาก ต้องหาไตเตอร์ ปัจจุบันใช้หมู่เลือด O RBC ผสมกับ FFP หมู่ AB หรือผสมกับพลาสมาหมู่เดียวกับเด็ก ดังตารางที่ 1

**2.2. Rh-HDN** อาการเหลืองของ Rh-HDN ปรากฏเร็วมากภายใน 24-48 ชั่วโมงหลังคลอด อาการอาจรุนแรงมาก เด็กมีอาการเกร็งอ่อน อาจตายในครรภ์ ส่วนใหญ่ไม่ใช่ครรภ์แรกแต่เป็น

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การเลือกเลือดที่เหมาะสม สำหรับการทำให้ ABO exchange transfusion

| หมู่เลือดทารก | หมู่เลือดมารดา | หมู่เลือด donor                         |
|---------------|----------------|-----------------------------------------|
| O             | O, A or B      | O                                       |
| A             | O, B<br>A, AB  | O*<br>A or O*                           |
| B             | O, A<br>B, AB  | O*<br>B or O*                           |
| AB            | A<br>B<br>AB   | A or O*<br>B or O*<br>A*, B*, AB, or O* |

\* ถ้าใช้เลือดต่างหมู่ เอบีโอ ต้องใช้เป็น RBC เท่านั้น

ครรภ์ที่สองขึ้นไป ประวัติการมีครรภ์และลูกคนก่อนๆ หรือประวัติเคยได้รับเลือดมาก่อน ช่วยเป็นแนวทางในการวางแผนการตรวจและวินิจฉัยได้เป็นอย่างดี การรักษาด้วยการถ่ายเลือด หากทันการก็สามารถช่วยได้ มารดาที่เป็น Rh-negative ทุกราย ถ้า antibody screening test ให้ผล negative ต้องตรวจซ้ำเป็นระยะๆ เช่น ทุก 3 เดือนในระยะต้น เมื่ออายุครรภ์เลย 6 เดือนไปแล้ว ควรตรวจซ้ำทุก 1-2 เดือนจนคลอด หลังคลอดแล้วถ้าพบว่าลูกเป็น Rh-positive และแม่ยังตรวจไม่พบ anti-D ในซีรัม ควรจะฉีด Rh immune globulin เข้ากล้ามเนื้อภายใน 72 ชั่วโมง จะสามารถป้องกัน Rh-HDN ในครรภ์ต่อไปได้

มารดาที่เป็น Rh-negative และ IAT ให้ผล positive ตั้งแต่ต้น ต้องรีบตรวจให้ทราบชนิดของ แอนติบอดี และติดตามดูไตเตอร์ของแอนติบอดี หากไตเตอร์เพิ่มมากกว่า 2 เท่า เช่น เดิม 64 เพิ่มเป็น 512 และถ้าขณะนั้นอายุครรภ์ถึง 24 สัปดาห์แล้ว ควรพิจารณาศึกษาคุณค่าของทารกด้วย ว่าสมควรเอาทารกออกก่อนกำหนดหรือไม่ เพื่อให้มีอันตรายต่อชีวิตเด็กน้อยที่สุด ทั้งนี้รวมทั้งมารดาที่เป็น D-weak ให้พิจารณาแบบ Rh-negative

**เกณฑ์การเตรียมเลือดสำหรับ HDN (Intrauterine and exchange transfusion)<sup>1,6</sup>**

1. เป็น RBC ที่ไม่มีแอนติเจนตรงกับแอนติบอดีของแม่ และ cross-matching เข้ากันได้กับเลือดแม่
2. CMV negative และผ่านการฉายรังสี (irradiated) ถ้าทำได้
3. มีอายุไม่เกิน 3-5 วัน เป็น leukodepleted red cells
4. ใช้พลาสมาหมู่ AB หรือหมู่เดียวกับเด็ก โดยผสมรวมกับ RBC ในข้อ 3
5. ทำการผสมด้วยวิธีปราศจากเชื้อใน laminar flow หลังผสมแล้วต้องใส่ภายใน 24 ชั่วโมง การผสมไม่จำเป็นต้องกังวลในส่วนผสมของ hematocrit (ปกติใช้ RBC 1 ยูนิต ผสมกับ FFP 1 ยูนิต hematocrit ประมาณ 50-70%)
6. การทำ cross-matching ให้ใช้ซีรัมหรือพลาสมาของแม่แทนของทารก จะดีกว่าใช้ของทารก เนื่องจากไตเตอร์ของแอนติบอดีในแม่สูงกว่าลูก ทำให้ตรวจพบได้ง่ายกว่า
7. ในกรณี Rh-HDN หากไม่สามารถหาเลือด Rh-negative และเด็กมีอาการของ kernicterus อาจต้องใช้เลือดของแม่ปั่นเอาเฉพาะ RBC เตรียมเป็น washed RBC (เพื่อขจัด anti-D ออก) ให้ไปก่อน หากแม่ไม่อยู่ในสภาพที่ให้เลือดได้ และจำเป็นต่อชีวิตจริงๆ อาจต้องให้เลือดผู้บริจาคที่ตรงหมู่กับทารก (Rh-positive) ไปก่อน เมื่อหาเลือด Rh-negative ได้แล้ว ก็ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่งหรือมากกว่า

นั้นถ้าจำเป็น อย่างไรก็ตามควรมีใบเซ็นยินยอมด้วย

### 3. การเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย<sup>6, 10</sup>

โรคธาลัสซีเมียเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ จากการศึกษาวิจัยพบว่าร้อยละ 1 ของประชากรไทยเป็นธาลัสซีเมีย และเป็นชนิดรุนแรงประมาณ 120,000 คน กระจายทั่วประเทศ ผู้ป่วยเหล่านี้ต้องเติมเลือดเป็นประจำทุก 1-2 เดือน เพื่อบรรเทาอาการซีด ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดบ่อย จะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดง สาเหตุจากแอนติเจนในผู้ป่วยและผู้บริจาคไม่ตรงกัน ทำให้เกิดปัญหาในการจัดเตรียมเลือดที่เข้ากันได้ให้กับผู้ป่วยในครั้งต่อไป อีกทั้งส่วนใหญ่มีอาการแพ้เลือดที่เกิดจากแอนติบอดีของเม็ดเลือดขาวและการหลั่ง cytokine ทำให้เกิดอาการไข้ขึ้น หนาวสั่น (febrile non hemolytic transfusion reaction: FNHTR) ประมาณร้อยละ 30 ของปฏิกิริยาจากการให้เลือดเป็นอาการของ FNHTR และประมาณร้อยละ 6 ของผู้ป่วยจะสร้าง unexpected antibody ต่อเม็ดเลือดแดงที่ทำให้เกิดปัญหาในการเตรียมเลือด การรักษาผู้ป่วยในปัจจุบัน แพทย์นิยมรักษาแบบ hyper transfusion therapy ซึ่งถ้ารักษาตั้งแต่อายุน้อยก็สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงกระดูกโครงสร้างของรูปร่างได้ ดังนั้นจึงเป็นการงานอันยิ่งใหญ่ของธนาคารเลือด ในการเตรียมเลือดให้กับผู้ป่วยโลหิตจางธาลัสซีเมียทุกราย ให้ได้ตามนโยบายแห่งชาติ

ในปี พ.ศ. 2542 พญ. ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา รองประธานมูลนิธิธาลัสซีเมียแห่งประเทศไทยได้ริเริ่มเชิญชวนองค์กรต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง คือมูลนิธิธาลัสซีเมีย ศ.พญ. คุณหญิงสุดศรา ทัญจินดา ประธานมูลนิธิธาลัสซีเมีย และ ศ.พญ. วรพรรณ ตันไพจิตร เลขาธิการฯ ประชุมกับศูนย์บริการโลหิตฯ ศ.พญ. พิมล เชี่ยวศิลป์ และสมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย ร่วมสัมมนาทางวิชาการ 2-3 ครั้ง จนได้ข้อเสนอแนะเป็น National guideline for blood transfusion in thalassemia และได้นำเสนอให้ใช้ทั่วประเทศ ซึ่งเป็นที่ยอมรับของแพทย์ผู้รักษาอย่างชัดเจน<sup>11</sup> แนวปฏิบัติ มี 5 ข้อ ดังนี้

**กำหนดแนวปฏิบัติ ในการเตรียมเลือดให้ผู้ป่วยโลหิตจางธาลัสซีเมีย<sup>6, 11, 12</sup>**

1. ใช้โลหิตเม็ดเลือดแดงเข้มข้น ที่เจาะภายใน 3-7 วัน (ต้องไม่เกิน 14 วัน)
2. ผ่านการทดสอบการติดเชื้อต่างๆ ตามเกณฑ์มาตรฐานของงานบริการโลหิต สภาวิชาชีพไทย ได้แก่ anti-HIV, HIV-Ag, HBs-Ag, anti-HCV และ syphilis (ปัจจุบันมีประกาศ ข้อกำหนด ให้ตรวจ Nucleic acid testing (NAT) ด้วย



3. ใช้ leukocyte-poor (LPRC) or depleted (LDRC) RBC ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด leukoagglutinin ทำให้มีอาการไข้ หนาวสั่นหลังรับโลหิต การกำจัดเม็ดเลือดขาว อาจใช้วิธีปั่น ซึ่งเหลือเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า  $5 \times 10^8$  เซลล์ต่อถุง หรือใช้วิธีการกรองโดยใช้ filter ซึ่งกำจัดเม็ดเลือดขาวเหลือน้อยกว่า  $5 \times 10^6$  เซลล์ต่อถุง นอกจากนี้ ควรใช้ LPRC หรือ LDRC สำหรับผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ว่าจะต้องได้รับการปลูกถ่าย หรือได้รับการปลูกถ่ายมาแล้ว หรือผู้ป่วยที่คาดว่าจะได้รับโลหิตในระยะยาว และผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการป้องกันการติดเชื้อ CMV จากการรับโลหิตอีกด้วย
4. จัดหาโลหิตที่มี minor blood group ตรงกัน เพราะจะเกิด minor blood incompatibility สำหรับผู้ป่วยใหม่หากเป็นไปได้ควรตรวจ red cell antigens (phenotyping : C, c, E, e, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Mi<sup>a</sup>) ก่อนให้เลือดครั้งแรก<sup>10</sup> เพราะประชากรไทยพบการสร้างแอนติบอดีเหล่านี้ได้บ่อย
5. ฉีดวัคซีน hepatitis B ให้กับผู้ป่วยทุกรายที่ยังไม่มีภูมิคุ้มกัน

การเตรียมเลือด LPRC นี้ จากการศึกษาวิจัยพบว่า เมื่อนำไปให้ผู้ป่วย<sup>13</sup> ทำให้ FNHTR ลดลงถึง 90% สำหรับประเทศไทยนั้น แอนติบอดีตัวที่ก่อให้เกิดปัญหาบ่อย และควรระวังในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ได้แก่ anti-E, anti-Mi<sup>a</sup>, anti-Le<sup>a</sup> และ anti-Le<sup>b</sup> จึงควรคัดเลือกผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง ตรงกับแอนติบอดีนั้นๆ<sup>9</sup>

#### 4. การเตรียมเลือดให้เด็กทั่วไปอายุมากกว่า 4 เดือน และกรณีฉุกเฉิน<sup>1, 6</sup>

ใช้หลักการและวิธีการ crossmatch เช่นเดียวกับผู้ใหญ่ ยกเว้นเด็กอายุยังไม่ครบ 1 ปี ยังไม่ต้องทำ reverse grouping และควรใช้เลือดกรองที่ปราศจากเม็ดเลือดขาว (LDRC) เพื่อลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ CMV ด้วย

#### การทำหัตถการและวิธีทดสอบพิเศษต่างๆ

ขอนำเสนอเทคนิคต่างๆ ที่ใช้บ่อยในการเตรียมเลือด วิธีที่สามารถนำมาแก้ปัญหาได้ผลดี ในการทำงานประจำวัน และข้อควรระวังในการเตรียมเลือดให้เด็กเพิ่มเติม ทั้งนี้สำหรับโรงพยาบาลที่หาหนังสืออ้างอิง อ่านเพิ่มเติมได้ลำบาก ได้แก่

1. การเจาะเลือดสันเท้าทารก
2. Direct and indirect antiglobulin test (DAT and IAT)
3. Elution technique (heat, acid)

4. Autoadsorption technique for removal of autoantibody (ZZAP reagent)
5. Differentiating IgG from IgM (DTT)
6. Assessment of fetomaternal haemorrhage (FMH)
7. Irradiated red cells : เลือดฉายรังสี

#### 1. การเจาะเลือดสันเท้าทารก

ควรเจาะบริเวณด้านล่างของเท้าแม่เท้า หรือบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านของเท้าทารก ดังรูปที่ 1 ก่อนเจาะให้ใช้ผ้าชุบน้ำอุ่นประคบเท้า ให้เลือดไหลดียิ่งขึ้น ไม่ควรเจาะซ้ำบริเวณแผลเดิมที่เคยเจาะแล้ว ให้ใช้ใบมีดหรือเข็มเจาะปลายนิ้ว เจาะในแนวขวางของลายนิ้วเท้า ใส่หลอดทดลอง EDTA ขนาด 1 มล. ที่มีฝาปิดให้เข็ดเลือดหยุดแรกออกก่อนเสมอ



รูปที่ 1 แสดงบริเวณสันเท้าเด็กที่สามารถทำการเจาะเลือดได้ (heel puncture) และบริเวณที่ไม่ควรเจาะเลือด

#### 2. DAT and IAT<sup>1</sup>

DAT เป็นการทดสอบหาแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย (sensitized red cells) ถ้า DAT ให้ผลบวกแสดงว่าเม็ดเลือดแดงอาจมีอายุสั้น เพราะถูกทำลายที่ตับหรือม้าม แอนติบอดีอาจเป็น alloantibody หรือ autoantibody ซึ่งสามารถถูก elution ออกได้หลายวิธี เพื่อนำไปตรวจหาความจำเพาะหรือชนิดของแอนติบอดีว่าเป็น IgG, IgM, IgA หรือ complement C3d, C3b โดยใช้แอนติบอดี monoclonal antibodies ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูป gel card ใช้หาความจำเพาะได้ วิธีทำ DAT โดยใช้เม็ดเลือดแดงของทารก ล้าง 3 ครั้งด้วย NSS ทำให้แห้งเติม antiglobulin serum

IAT เป็นการทดสอบหาแอนติบอดี ที่อยู่ในซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วย โดยการนำเซลล์ที่ทราบชนิดของแอนติเจนแล้วมาทดสอบเนื่องจากวิธีตรวจ DAT ในผู้ป่วย HDN มีความไวไม่เพียงพอ เพราะแอนติเจนบนผิวเซลล์อ่อน จึงต้องใช้ adult A-cells หรือ adult B-cells เป็นตัวชี้วัดการเกาะของแอนติบอดี

### Indirect antiglobulin test for suspected ABO-HDN

1. เตรียม 2-5 % cell suspension ของ adult A<sub>1</sub>-cells, adult B-cells และ adult O-cells
2. หยดซีรัมลงในหลอดทดลอง จำนวน 2 หยด
3. หยด 2-5 % cell suspension ลงในหลอดทดลองจำนวน 2 หยด โดยเลือกใช้ cell suspension ที่เป็น ABO หมู่เดียวกับผู้ป่วย
4. นำไป incubate ที่ 37°ซ นาน 60 นาที
5. ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย NSS (ล้างครั้งสุดท้ายต้องซับให้แห้ง)
6. เติมน้ำ antoglobulin serum จำนวน 1-2 หยด
7. ปั่นที่ 3,400 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที อ่านผลการทดลองด้วยตาเปล่าและกล้องจุลทรรศน์

### การอ่านผลและการแปลผล

อ่านผลปฏิกิริยาเป็น negative, weakly positive, 1+, 2+, 3+, และ 4+ ถ้าผล IAT positive แสดงว่ามี anti-A หรือ anti-B มาเกาะบนเม็ดเลือดแดง อาจเป็นสาเหตุของ ABO-HDN ต้องทำ elution ต่อไป

### 3. Elution technique<sup>1</sup>

การแยกแอนติบอดีออกจาก sensitized cells มีหลายวิธี เนื่องจากการเกาะกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดง เป็น covalent bond ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้ง่ายด้วยการใช้ความร้อน (heat elution) การลด pH (acid elution) และ ether elution เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนหรือแอนติบอดีนั้นๆ แอนติเจนบางชนิดจะถูกทำลาย จึงต้องเลือกตามความเหมาะสม ตัวอย่างเช่น วิธีที่ดีที่สุดสำหรับการ elute แอนติบอดีในกรณีของ ABO-HDN คือ heat elution ส่วนวิธี ether elution และ acid elution นั้นเหมาะสำหรับการ adsorb ของ autoimmune antibodies

#### 3.1 Heat Elution

การใช้ความร้อนในการทำ elution มี 2 แบบ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่า สิ่งที่ต้องการนำไปใช้นั้นคืออะไร เช่น หากต้องการใช้แอนติบอดี ควรใช้วิธี heat elution ที่ 56°ซ ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเป็นส่วนใหญ่ แต่หากต้องการนำเม็ดเลือดแดงไปใช้ ควรเลือกวิธี gentle heat elution ที่ 45°ซ แทน

#### วิธีทำ

1. ล้างเม็ดเลือดแดงที่มี DAT positive จำนวน 6 ครั้ง ด้วย NSS เก็บน้ำล้างสุดท้ายเป็น final wash
2. ใช้ washed red cells 1 ส่วน + 6% albumin 1 ส่วน ในหลอด 13x100 มม.
3. นำไปอุ่นที่ 56°ซ นาน 10 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ ปั่นที่ 1,000 g นาน 2-3 นาที

4. ดูดส่วน eluate ใส่ในหลอดทดลอง eluate จะมีสีดำนวล เกิดจาก partial hemolysis ของเม็ดเลือดแดง ให้รีบแยก eluate solution ออกจากเม็ดเลือดแดงโดยเร็ว ก่อนถูก adsorb กลับ
5. ทดสอบ eluate ควบคู่กับ final wash saline เพื่อหาชนิด และไตเตอร์ โดยทดสอบกับ adult A<sub>1</sub>, B และ O cells ที่ saline, 37°ซ และ AGT หรือ ทดสอบกับ panel red cells ด้วยวิธี indirect antiglobulin test (IAT) , enzyme หรือ albumin อาจใช้ PEG หรือ LISS เป็น enhancing medium
6. การทดสอบต้องทำทันที เพราะแอนติบอดีที่ elute ได้ไม่เสถียร แต่หากมีความจำเป็นต้องเก็บไว้ ให้เติม AB plasma หรือ albumin เก็บแช่แข็งไว้ที่ -20°ซ

### วิธีทำ Gentle heat elution (Heat elution ที่ 45°ซ)

ในกรณีที่เม็ดเลือดแดงถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีชนิด IgG ทำให้ไม่สามารถตรวจหมู่เลือด หรือทำ RBC phenotyping ได้ จำเป็นต้อง elute เอาแอนติบอดีที่เคลือบออก โดยวิธี gentle heat elution ที่ 45°ซ จะสามารถถอนเม็ดเลือดแดงไม่ให้แตกได้

1. ใช้ washed red cells 1 ส่วน + NSS 3 ส่วน
2. อุณหภูมิทั้งสองที่ 45°ซ นาน 10-30 นาที โดยเขย่าเป็นระยะๆ
3. ปั่นล้างเซลล์
4. ทดสอบเซลล์ด้วยการทำ DAT อีกครั้งหนึ่ง ถ้ายังให้ผลบวก ให้ทำการทดสอบซ้ำในข้อ 1-3

### 3.2 Acid Elution (DiaCidal)<sup>14</sup>

DiaCidal เป็น commercial kit ที่สะดวกในการใช้งานสำหรับการแยก autoantibody และ alloantibody ออกจากเม็ดเลือดแดง ประกอบด้วยน้ำยา 3 ชนิด ได้แก่

- 1.2.1 Wash solution : glycine-NaCl buffer dilute 1:10 in distilled water for working solution
- 1.2.2 Elution solution : low pH glycine buffer with color indicator
- 1.2.3 Buffer solution : Tris buffer + 1.2 % bovine albumin

#### วิธีทำ

1. ล้างเม็ดเลือดแดงที่มี DAT บวก 1 มล. ด้วย NSS จำนวน 1 ครั้ง
2. ล้างต่อ ด้วย wash working solution อีก 4 ครั้ง
3. ดูด NSS ออกให้หมด เหลือแต่ packed red cells

(กรณีต้องการทดสอบ alloantibody ให้เก็บน้ำล้างครั้งสุดท้าย)

4. เติมน้ำ elution solution 1 มล. เขย่าผสมกัน
5. ปั่นทันที และถ่ายใส่หลอดใหม่ที่สะอาด เพื่อป้องกัน carry-over
6. เติมน้ำ buffer solution 5 หยด eluate ควรมีสีน้ำเงิน (neutral pH 6.5-7.5) หรือเติมน้ำ buffer solution เพิ่มจนเป็นสีน้ำเงิน
7. ปั่น 3000 rpm นาน 10 วินาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง

#### 4. การทำ Autoadsorption technique เพื่อขจัด autoantibody<sup>1,7,8</sup>

ในกรณีที่ผู้ป่วยมี autoantibody ก่อนข้างแรง และ DAT ให้ผลบวก หากสงสัยว่ามี alloantibody ร่วมด้วย จำเป็นต้องทำ autoadsorption โดยใช้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเองดูดซับ autoantibody ออกไป ให้เหลือแต่ alloantibody บางครั้งพบว่าดูดซับไม่หมด ต้องใช้ enzyme ไป treat เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเองก่อนนำไปทำการดูดซับ ปัจจุบันนิยมใช้น้ำยา Sulfhydryl-Proteolytic enzyme reagent (ZZAP) ซึ่งให้ผลดีกว่าวิธี heat elution มาก เพราะไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และซีรัมไม่ถูก dilute มากจนเกินไป น้ำยานี้เป็นส่วนผสมของ sulfhydryl reagent (S-S) เช่น dithiothreitol (DTT) หรือ 2-mercaptoethanol (2-ME) กับ proteolytic enzyme (AP) เช่น papain หรือ ficin ซึ่งสามารถไปลด immunoglobulin ที่เคลือบบนผิวเม็ดเลือดแดงได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งปฏิกิริยาของ enzyme ทำให้เม็ดเลือดแดงมีพลังในการดูดซับ autoantibody ได้มากขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ทำลาย autoantibody ที่เป็น IgM ไปด้วยกัน โดยทำลาย disulfide bond ของ IgM ทำให้ 19S ถูกเปลี่ยนเป็น 7S และยังมีฤทธิ์ในการดึง IgG ให้หลุดออกจากผิวเซลล์ แต่เดิมใช้ชื่อว่า SSAP ต่อมาถูกเปลี่ยนให้สละสลวยขึ้นเป็น ZZAP<sup>9</sup>

#### น้ำยา ZZAP pH 6.0-6.5

ZZAP = 0.5 มล. cysteine-activated papain + 2.5 มล. DTT + 2 มล. PBS pH 7.3 ส่วนประกอบได้แก่

1. 1% cysteine -activated papain : Stock 1% papain + L-cysteine hydrochloride แบ่งเป็น aliquots 1 มล. เก็บ -20°C
2. 0.2M DTT (1 ก. DTT in 32.4 มล. PBS) (เก็บที่ -80°C)
3. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.3 (solution A 16 มล. + solution B 84 มล.)

#### วิธีทำ ZZAP treat red cells

1. ZZAP reagent 2 มล. ผสมกับเม็ดเลือดแดงผู้ป่วย 1

มล. (ไม่ต้องล้างเซลล์)

2. อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที
3. ล้างเซลล์ 3 ครั้ง ด้วย NSS ครั้งสุดท้าย ให้ดูดเอาน้ำล้างออกให้หมด แบ่งเป็น 2-3 ส่วน

#### วิธีทำ Autoadsorption

1. ซีรัมผู้ป่วย (autologous serum) 1 มล. + ZZAP treat red cells 1 มล.
2. กรณี cold autoadsorption อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที
3. กรณี warm autoadsorption อุณหภูมิ 37°C นาน 30-45 นาที
4. ปั่น 1000 g นาน 5 นาที แยกซีรัม ผู้ป่วยนำไปทดสอบต่อไป

#### ข้อควรระวัง

1. ในกรณีที่ผู้ป่วยเคยได้รับเลือดภายใน 3 เดือน ไม่ควรทำ autoadsorption เพราะเม็ดเลือดแดงอาจไปดูดซับ alloantibody ในตัวผู้ป่วยได้
2. การใช้ ZZAP ทำ autoadsorption ทำเพียงสองครั้งก็สามารถดูดซับได้หมด (ไม่ควรเกิน 4 ครั้ง)
3. ถ้าซ้ำหลายครั้งแล้วยังไม่หมด แสดงว่า papain หรือ DTT ไปทำลายแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง โดยเฉพาะ ระบบ Kell, Duffy และ MNS ให้เปลี่ยนเป็น heat elution แทน ก่อนนำเม็ดเลือดแดงไปทำ autoadsorption

**หมายเหตุ** หากไม่มี ZZAP อาจใช้วิธีเจือจางซีรัมผู้ป่วย เป็น 1/2, 1/4 หรือ 1/8 ทำการทดสอบเพื่อดูว่าที่ dilution ไດ พบ autoantibody ลดลงหรือหายไป เหลือแต่ alloantibody ให้ใช้ซีรัมที่ dilution นั้นมาทำ cross-matching หรือ antibody identification วิธีนี้มีข้อเสียคือ alloantibody ถูกเจือจางไปด้วย

#### 5. Differentiating IgG from IgM

เป็นการทดสอบที่ใช้แยกชนิดของแอนติบอดีว่าเป็นชนิด IgG หรือ IgM หากแอนติบอดีไม่แรงมาก อาจใช้วิธีการเจือจางซีรัมนำไปเคลือบบนเม็ดเลือดแดง แล้วทดสอบด้วยวิธี column agglutination technique (CAT) เช่น gel หรือ glass beads เพื่อแยกชนิดของ IgG, IgM, และ C3d อย่างไรก็ตาม วิธี DTT ยังเป็นวิธีดั้งเดิมที่นิยมใช้อยู่ในรายที่มีความซับซ้อน

#### น้ำยา DTT

PBS pH 7.3 และ 0.01M DTT (0.154 ก. DTT in 100 มล. PBS)

#### วิธีทำ

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 12x75 มม. จำนวน 2 หลอด ติดฉลากเป็น PBS control และ DTT test
2. เติมน้ำซีรัม ทั้ง 2 หลอด หลอดละ 1 มล.

3. เติม PBS ในหลอด PBS control และเติม DTT ในหลอด DTT test หลอดละ 1 มล.
4. อุณหภูมิ 37°C นาน 30-60 นาที นำไปทำไตเตอร์ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

การอ่านผล (ตามตารางที่ 2)

#### 6. Assessment of fetomaternal haemorrhage (FMH)<sup>1</sup>

การประเมินการมีนัยสำคัญของจำนวน fetal cells ที่หลุดลอดเข้าสู่ระบบไหลเวียนของมารดา เพื่อกำหนดขนาดของยา Rh-immunoglobulin ที่ต้องฉีดป้องกันการเกิด anti-D ในหญิงตั้งครรภ์ที่เป็น Rh-negative ปัจจุบันอาจใช้วิธี flow cytometry หรือ commercial kit แต่วิธีทดสอบดั้งเดิมยังคงใช้กันคือ Kleihauer-Betke Test (Differential acid elution stain) ใช้หลักการว่า acid จะไป elute adult HbA กลายเป็น maternal ghost cells ส่วน fetal cells HbF ไม่ถูก elute เมื่อย้อมสีจะติดสีเข้ม ชมพูวาว สว่างใส เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การทดสอบนี้มีความไวมาก หากมี fetal cells หลุดลอดเข้าสู่มารดาประมาณ 0.2-1 มล. ก็สามารถตรวจพบได้

น้ำยา

1. Solution A : 0.1 M citric acid (21.0g  $C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$ ) ละลายน้ำ 1 ลิตร เก็บในตู้เย็น
2. Solution B : 0.2 M Sodium phosphate (53.6g  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ) ละลายน้ำ 1 ลิตร เก็บในตู้เย็น
3. McIlvaine's buffer pH 3.2 : Solution A 75 มล.

+ Solution B 21 มล. เตรียมใหม่เก็บอุณหภูมิห้อง

4. 80% ethyl alcohol
5. สี Erythrosin B (0.5% in water) และสี Harris hematoxylin (filtered)
6. Control : ใช้ adult cells 10 ส่วน ผสม cord blood หนึ่งเดียวกัน 1 ส่วน

วิธีทำ

1. เจาะเลือดมารดา เป็น clotted blood หรือ anti-coagulated blood 1-2 มล.
2. เจือจางด้วย NSS เท่าตัว แล้ว smear บางๆ บนแผ่น slide ทิ้งให้แห้ง
3. Fix smear ด้วย 80% ethyl alcohol นาน 5 นาที
4. ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วจุ่มใน McIl buffer นาน 11 นาที
5. ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วจุ่มใน Erythrosin B นาน 5 นาที
6. ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วจุ่มใน hematoxylin นาน 5 นาที
7. ล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านนาน 1 นาที
8. ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x40 นับจำนวน fetal cells ต่อ adult cells 2,000 ตัว
9. คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ fetal cells ต่อเซลล์ทั้งหมด
10. นำเปอร์เซ็นต์ที่ได้ x50 เพื่อคำนวณกลับเป็นปริมาตร (มล.) ของ fetomaternal haemorrhage
11. กำหนดขนาดของ Rh-immunoglobulin ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2

| Test sample | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | Interpretation                   |
|-------------|-----|-----|-----|------|------|----------------------------------|
| Serum+ DTT  | 3+  | 2+  | 2+  | 1+   | 0    | ปฏิกิริยาไม่ลดลง แสดงว่าเป็น IgG |
| Serum+ PBS  | 3+  | 2+  | 2+  | 1+   | 0    |                                  |
| Serum+ DTT  | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | DTT ลด แต่ PBS ไม่ลดลง           |
| Serum+ PBS  | 3+  | 2+  | 2+  | 1+   | 0    | แสดงว่าเป็น IgM                  |
| Serum+ DTT  | 2+  | 1+  | 0   | 0    | 0    | DTT ลดบางส่วน แต่ PBS ไม่ลดลง    |
| Serum+ PBS  | 3+  | 2+  | 2+  | 1+   | 0    | แสดงว่าเป็น IgG+IgM              |

ตารางที่ 3 Rh Immunoglobulin Dosage for fetomaternal haemorrhage<sup>1</sup>

| % fetal cells | Vial to inject | ug   | IU   |
|---------------|----------------|------|------|
| 0.3-0.8       | 2              | 600  | 3000 |
| 0.9-1.4       | 3              | 900  | 4500 |
| 1.5-2.0       | 4              | 1200 | 6000 |
| 2.1-2.6       | 5              | 1500 | 7500 |



## 7. Irradiated red cells : เลือดฉายรังสี

การฉายรังสีเลือดเพื่อป้องกันการเกิด Transfusion-associated graft versus host disease (TA-GVHD) โดยทั่วไป lymphocyte ของผู้บริจาค จะถูกทำลายโดยกลไกการขจัดสิ่งแปลกปลอม แต่ในกรณีที่ผู้ป่วยมีระบบภูมิคุ้มกันต่ำมาก เช่นทารกแรกคลอด และผู้ที่ได้รับสารกดภูมิคุ้มกัน หรือผู้ที่ได้รับโลหิตจากผู้ร่วมสายโลหิต ซึ่งผู้บริจาคมี HLA haplotype เป็น homozygous และไปเหมือนกับหนึ่งในสอง haplotype ของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยทั้งสองกรณีไม่สามารถขจัด lymphocyte ของผู้บริจาค Lymphocyte เหล่านี้จะเข้าไป engraft และแบ่งตัวในไขกระดูกของผู้ป่วย และสามารถไปทำลายเซลล์ของผู้ป่วย ทำให้เกิดภาวะ TA-GVHD ผู้ป่วยมีผื่น 10-14 วันหลังได้รับเลือด ผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากการติดเชื้อ หรือภาวะเลือดออก ยังไม่มีวิธีการรักษา จึงต้องหาทางป้องกันไว้ก่อน เลือดที่ผ่านการกรองเม็ดเลือดขาวออกแล้ว Leukocyte depleted pack red cells (LDPRC) ยังไม่เพียงพอในการป้องกัน TA-GVHD จึงจำเป็นต้องฉายรังสีร่วมด้วย อย่างไรก็ตามแม้ TA-GVHD พบได้น้อยมาก แต่ AABB ได้กำหนดกลุ่มเสี่ยงของโรค ที่ต้องได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือดที่ฉายรังสีแล้ว ได้แก่ผู้ป่วยที่ทำ Bone marrow transfusion, Exchange transfusion, Intrauterine transfusion, Premature infants และผู้ป่วยที่ได้รับเลือดจากครอบครัวเดียวกัน หรือญาติสายตรง เป็นต้น

ส่วนประกอบของเลือดที่นำมาฉายรังสีส่วนใหญ่ เป็นเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและเกล็ดเลือด ฉายด้วยรังสีแกมมา 25 Gy (2500 cGy or rad) โดยมี Caesium-137 เป็นแหล่งกำเนิด (dose ที่จุดศูนย์กลางอย่างต่ำและไม่เกิน 2,500 cGy และบริเวณรอบข้างอย่างต่ำ 1,500 cGy) ใช้เวลาฉายประมาณ 5-10 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดรังสี เลือดที่ฉายรังสีแล้วมีอายุไม่เกิน 28 วัน นับจากวันที่ฉายหรือหมดอายุในวันที่เลือดหมดอายุ ทั้งนี้แล้วแต่วันที่ได้จะถึงก่อนกัน สำหรับเลือดฉายรังสีของเด็กนั้น ต้องเป็นเลือดใหม่ที่มีอายุไม่เกิน 5 วัน เพื่อหลีกเลี่ยง hyperkalemia เมื่อฉายแสงแล้วต้องใช้สำหรับเด็กภายใน 4 วัน<sup>15, 16</sup> หากเก็บนานกว่านี้ไม่เหมาะสำหรับเตรียมให้เด็ก แต่สามารถนำไปให้กับผู้ใหญ่ได้

ปัจจุบันเครื่องฉายรังสีเลือด (blood irradiator) ในประเทศไทย นอกจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติแล้ว ยังมีที่โรงเรียนแพทย์อีกหลายแห่ง เช่น โรงพยาบาลศิริราช โรงพยาบาลรามาธิบดี โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

## สรุป

การให้เลือดในเด็กนั้น มีความซับซ้อนในการให้บริการ ที่ต้องคำนึงถึงผลประโยชน์ของผู้ป่วยเป็นสำคัญ การเตรียมเลือดจึงต้องอาศัยความรู้ทั้งด้านทฤษฎีและปฏิบัติในหลายๆมิติ ผลผสมผสานกัน ตัวอย่างเช่น ไม่ต้องทดสอบ reverse grouping ในเด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี หรือ การไม่สร้างแอนติบอดีของทารกอายุน้อยกว่า 4 เดือน เป็นผลให้ไม่จำเป็นต้องทำ cross-matching หรือตรวจ ABO, Rh ซ้ำ ตลอดการอยู่ในโรงพยาบาลแต่ละครั้ง หรือต้องการเลือดแม่ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเลือดในบางกรณี เป็นต้น

นอกจากนี้ลักษณะของเลือดที่เตรียม มีความหลากหลาย เช่น การเตรียมเลือดที่มีอายุน้อยกว่า 3 วันสำหรับ exchange transfusion ในเด็ก HDN หรือเลือดที่มีอายุน้อยกว่า 5 หรือ 7 วัน แต่ไม่เกิน 15 วัน สำหรับผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การทำ RBC phenotype ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียรายใหม่ทุกราย การเตรียมเลือดฉายรังสีสำหรับเด็กคลอดก่อนกำหนด หรือการเติมเลือดในครรภ์ การเตรียมเลือดกรองหรือปั่นเอาเม็ดเลือดขาวออกเพื่อป้องกันอาการไข้ขึ้นหนาวสั่น การแบ่งเลือดเป็นยูนิตเล็กในระบบปิดเพื่อลดโอกาสติดเชื้อ และป้องกันการถูกกระตุ้นด้วยเลือดจากผู้บริจาคหลายคนให้เหลือน้อยที่สุด นอกจากนี้เลือดในน้ำยา additive solution เช่น CPD-A1, Adsol, หรือ Mannitol สามารถให้ในเด็กได้ ยกเว้นเด็กคลอดก่อนกำหนด เด็กที่มีโรคไต โรคตับ หรือได้รับ massive transfusion เช่น exchange transfusion เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

1. Roback JD, editor. *Technical Manual*, 16<sup>th</sup> ed. American Association of Blood Bank, 2008.
2. Price TH, ed. *Standards for blood banks and transfusion services*. 25<sup>th</sup>ed. Bethesda, MD: AABB, 2008.
3. Armstrong B. Hemolytic diseases. *ISBT Sci Ser* 2008;3:93-109.
4. Richards CA. Hemolytic diseases of the newborn. In : Quinley ED. *Immunohematology principle and practice*. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Lippincott 1998:283-94.
5. White J. Pre-transfusion testing. *ISBT Sci Ser* 2009;4:37-44.
6. World Health Organization. *Blood Transfusion safety: The Clinical Use of Blood: Handbook*. 2003. Malta: WHO, Interprint Limited.
7. Issitt PD, Issitt CH : *Applied blood group serology*. Second edition, West Chester, PA, Spectra Biologicals, 1975, p25.
8. Branch DR, Petz LD. A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. *Am J Clin Pathol* 1982;78: 161-7.
9. ศศิธร เพชรจันทร์ *Transfusion support in pediatrics การประชุมเชิงปฏิบัติการ งานบริการโลหิตระดับชาติ ประจำปี พ.ศ. 2549 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย* 2006;3:21-32.

9. บุญเชียร ปานเสถียรกุล แนวทางการวินิจฉัยและรักษาโรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย. *Clinical practice guidelines for diagnosis and management* กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2549, พร้อมมิติการพิมพ์. กรุงเทพฯ. p12.
10. ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา. National guideline for blood transfusion in Thalassemia. แบบประวัติและแบบเสนอผลงาน "รางวัลมหาวิทยาลัย-ปีบราวน์ 2547" ของ ศ.เกียรติคุณ พญ. ภัทรพร อิศรางกูร ณ อยุธยา.
11. พิมพ์ เชื้อยัคิลป์ Use of Leukodepleted blood products: Situation analysis and guideline development. *Thai J Hemato and Transf* 2008;18:343-5.
12. ลัดดา ฟองสถิตย์กุล. Novel blood components and blood products: modified inverted centrifugation (MIC) for LDPRC การประชุมใหญ่วิชาการ ประจำปี พ.ศ. 2542 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย 2542;98-110.
13. Leaf-let of DiaMed-reagents for acid elution of serological antibodies : DiaCidel : DiaMed AG, Switzerland; 2009.
14. วิโรจน์ จงกลวัฒนา Update in neonatal blood transfusion การประชุมวิชาการ Hospital Blood Bank 2009 ห้องประชุมตรีเพชร คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล 1-3 ธันวาคม 2552.
15. ศศิธร เพชรจันทร์. ใน : ศศิธร เพชรจันทร์, อ้อยทิพย์ ณ ถลาง, บรรณาธิการ. 108 คำถามงานธนาคารเลือด. กรุงเทพฯ : ชัยเจริญการพิมพ์, 2549. p43, p53.