นิพนธ์ต้นฉบับ

การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงสำหรับตรวจหมู่โลหิตด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3

วชิราภรณ์ ยนต์วิเศษ กษะมา เอี่ยมรักษา และ สาธิต เทศสมบูรณ์
ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

บทนำ *การตรวจหมู่โลหิตโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ต้องใช้เม็ดเลือดแดงที่ถูก magnetized (Hemalys A1, B) ในการตรวจ ABO serum grouping ที่ผลิตและขนส่งจากประเทศฝรั่งเศส ซึ่งใช้ระยะเวลาในการขนส่งนาน บางครั้งพบปัญหาขนส่งไม่ทันต่อการใช้งาน ทำให้ไม่สามารถรายงานผลตรวจได้ทันตามเวลาที่กำหนดซึ่งส่งผลกระทบต่อการจ่ายโลหิตเพื่อรักษาผู้ป่วย จึงได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียม cell A, B magnetized red cells ใช้เองในห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจหมู่โลหิต ABO serum grouping ด้วยเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ของภาคบริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย* ***วัสดุและวิธีการ*** *ศึกษาวิธีการ magnetized red cells ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้ เติมเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A และ B แยกตามหมู่โลหิตรวมกับ Magnelys ลงในขวด A-G และเติมสารเรียงลำดับดังนี้ Bromeline, Alserver's solution, 0.9% NSS, low ionic strength solution (LISS), Alserver's solution + 1.8% ethylene diamine tetra-acetate (1.8% EDTA), 0.9% NSS + 1.8% EDTA และ Alserver's solution + 3.6% EDTA ในปริมาณต่างๆ แล้วนำไปตรวจ ABO serum grouping ด้วยเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 เพื่อประเมินวิธีเตรียมที่เหมาะสม หลังจากนั้นศึกษาระยะเวลาในการ magnetized red cells ก่อนใช้งาน ประเมินความคงทนและประเมินประสิทธิภาพ magnetized red cell ที่เตรียมใช้เองกับ Hemalys A1, B* ***ผลการศึกษา*** *พบว่าวิธีการเตรียมโดยเติมเม็ดเลือดแดงรวมกับ Magnelys เขย่าบน rotator 10 นาที เติม 0.9% NSS + 1.8% EDTA (วิธี F) และเติม Alserver's solution + 3.6 g/L EDTA (วิธี G) เป็นวิธีที่เหมาะสม ซึ่งต้องเตรียมก่อนใช้งานเป็นเวลา 2 และ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเมื่อศึกษาความคงทนพบว่า วิธี F มีความเสถียรกว่าวิธี G ซึ่งวิธี F มีค่าความถูกต้องร้อยละ 98.49 และค่าความแม่นยำร้อยละ 99.23* ***สรุป*** *เซลล์ที่เตรียมโดยการเติมเม็ดเลือดแดง 80 ไมโครลิตรที่ถูก magnetized ด้วย Magnelys 1,920 ไมโครลิตร เติม 0.9% NSS 5,500 ไมโครลิตร และ 1.8% EDTA 500 ไมโครลิตร ซึ่งต้องเตรียมก่อนใช้งานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง เป็นวิธีที่เหมาะสม สะดวก ง่าย และสามารถเก็บเซลล์ไว้ใช้ได้อย่างน้อย 7 วัน*

คำสำคัญ : ● *เม็ดเลือดแดงที่ถูกทำให้มีความเป็นแม่เหล็ก* ● *การตรวจหมู่โลหิต ABO* ● *การตรวจหมู่โลหิต ABO ในซีรัม*
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2563;30:119-27.

ได้รับต้นฉบับ 16 มีนาคม 2563 แก้ไขบทความ 24 เมษายน 2563 รับลงตีพิมพ์ 13 พฤษภาคม 2563

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ วชิราภรณ์ ยนต์วิเศษ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ ถ.โกสีย์ใต้ ต.ปากน้ำโพ อ.เมือง จ.นครสวรรค์ 60000
E mail: vashiraporn_sine@yahoo.com

Original article

Preparation of magnetized red cells for ABO serum grouping by Qwalys 3 blood grouping automation

Vashiraporn Yonwises, Kasama Eamruksa and Sathit Tadsomboon

Regional Blood Center VIII Nakhonsawan province, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: *ABO grouping by Qwalys 3 requires magnetized red blood cells (Hemalys A1, B) for serum grouping which were produced and transported from France. Due to long distance, delayed transportation and 30-day-expiratory date, magnetized red blood cells were sometimes insufficient for testing. The purpose of this study is to prepare home made magnetized red cells and compare with Hemalys A1, B.* ***Materials and Methods:*** *Prepared magnetized red blood cells for serum grouping by Qwalys 3 and divided into 7 bottles (method A-G) by add A, B red blood cells + Magnelys to every bottle, each bottle, add Bromeline, Alserver's solution, 0.9% NSS, low ionic strength solution (LISS), Alserver's solution + 1.8% ethylene diamine tetra-acetate (1.8% EDTA), 0.9% NSS + 1.8% EDTA and Alserver's solution + 3.6% EDTA into bottle A-G, respectively. Afterthat, tested ABO serum grouping by Qwalys 3 to find the suitable method and evaluated the appropriate time of preparation before ues. Then evaluated the reaction and physical characteristics of red blood cells in 7 days and compared 398 known ABO samples between the use of home made magnetized red cells with Hemalys A1, B.* ***Results:*** *The preparation of magnetized red cells by method F: red blood cell 80 μL + Magnelys 1,920 μL + 0.9% NSS 5,500 μL + 1.8% EDTA 500 μL and method G: red blood cell 80 μL + Magnelys 1,920 μL + Alserver's solution 8,320 μL + 3.6% EDTA 500 μL which had to be prepared 2 and 7 hours before use, respectively, were found to be appropriated methods. At day 7, magnetized red cells prepared by both methods can be used to detect ABO blood group. Furthermore, hemolysis and bacterial contamination were not found. Prepared magnetized red cells by method F when compared with Hemalys A1, B, had accuracy and precision of 98.49% and 99.23%, respectively.* ***Conclusion:*** *Home made prepared magnetized red cells by using red blood cells 80 μL + Magnelys 1,920 μL + 0.9% NSS 5,500 μL + 1.8% EDTA 500 μL has low cost, convenient and can be used for at least 7 days.*

Keywords : ● *Magnetized red cells* ● *Blood grouping* ● *ABO serum grouping*

J Hematol Transfus Med. 2020;30:119-27.

บทนำ

เลือดและส่วนประกอบของเลือดมีประโยชน์ในการช่วยชีวิตผู้ป่วย ในขณะเดียวกันอาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการแทรกซ้อนจากการรับโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตได้[1] อาการแทรกซ้อนที่สำคัญและพบอัตราการเสียชีวิตที่สูง คือ การเกิด acute hemolytic transfusion reactions (AHTRs)[2] ซึ่งเกิดภายหลังผู้ป่วยได้รับโลหิตภายใน 1-2 ชั่วโมง โดยแอนติบอดีของผู้ป่วยทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่ให้มีการกระตุ้นระบบคอมพลีเม้นท์ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก[3] อาการแสดงคือ ผู้ป่วยมีไข้ หนาวสั่น แน่นหน้าอก ความดันโลหิตต่ำ จนถึงเกิดภาวะ shock[4] สาเหตุส่วนมากมักเกิดจากการให้โลหิตผิดหมู่ จากการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1976 ถึง ค.ศ. 1985 พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับโลหิตเกิดปฏิกิริยาจากการรับโลหิต 355 ราย ในจำนวนนี้ 158 รายเกิดปฏิกิริยาแบบเฉียบพลัน ซึ่ง 131 ราย เกิดจากการให้โลหิต ABO ผิดหมู่[5] ในประเทศไทย จากการสำรวจข้อมูลปี พ.ศ. 2546 โดยคณะอนุกรรมการวิชาการในคณะกรรมการจัดหาและส่งเสริมผู้ให้โลหิตแห่งสภากาชาดไทย พบว่า มีอัตราการให้โลหิตผิดหมู่ในระบบ ABO 1 : 20,000 เกิด acute hemolysis 1 : 34,000 และพบอัตราตาย 1 : 50,000[6] ความผิดพลาดเริ่มมาจากขั้นตอนการเจาะโลหิตผิดคนทั้งด้านผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วย การตรวจหมู่โลหิตผิดพลาดในผู้บริจาคโลหิต การตรวจความเข้ากันได้ของโลหิต การหยิบโลหิตผิดถุง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นความผิดพลาดที่มาจากบุคลากร[7,8]

งานตรวจคัดกรองโลหิต ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ สภากาชาดไทย ตรวจคัดกรองโลหิตผู้บริจาคโดยดำเนินตามนโยบายงานบริการโลหิตแห่งชาติ พ.ศ. 2553[9] ซึ่งตระหนักถึงการลดความผิดพลาดจากบุคลากรทั้งในด้านการตรวจและการบันทึกผล ประกอบกับปัจจุบันภาระงานที่มากขึ้น ความต้องการผลการตรวจที่รวดเร็ว จึงได้มีการนำเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติมาใช้งาน โดยปัจจุบันใช้เครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 (บริษัท Diagast, ประเทศฝรั่งเศส) ในการตรวจหมู่โลหิตซึ่งอาศัยหลักการ Erythrocyte-magnetized technology (E.M.® Technology)[10] เป็นเทคโนโลยีนำอนุภาคแม่เหล็กไปเกาะบนผิวของเม็ดเลือดแดง เมื่อเซลล์เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีเซลล์จะถูกดูดด้วยแม่เหล็กตกสู่ก้นหลุม แทนการปั่นตกตะกอน[11] สำหรับ Hemalys A1, B เป็นเซลล์ที่ผลิตและขนส่งจากประเทศฝรั่งเศส โดยตลอดระยะเวลาในการขนส่งต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมในการรักษาสภาพ ประกอบกับเซลล์มีอายุ 45 วัน ทำให้บางเดือนพบปัญหาขนส่งไม่ทันต่อการใช้งานจึงไม่มีเม็ดเลือดแดงที่ถูก magnetized ใช้ในการทดสอบ จากข้อมูลปี พ.ศ. 2560 พบปัญหาการขนส่งเซลล์ Hemalys A1, B ล่าช้า จำนวน 2 ครั้ง และพบเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 แปลผล serum grouping ไม่ได้ แต่เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธีหลอดทดลองโดยเซลล์ที่เตรียมจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย พบเกิดปฏิกิริยาชัดเจน ซึ่งการตรวจด้วยวิธีหลอดทดลอง มีความเสี่ยงในการบันทึกผลการตรวจในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ด้วยบุคลากร มีโอกาสผิดพลาดสูง เสียเวลาในการปฏิบัติงาน รวมทั้งเพิ่มระยะเวลารอคอยผลการตรวจ ซึ่งอาจไม่ทันต่อการใช้โลหิตของผู้ป่วยโดยเฉพาะเกล็ดเลือด และจากการสังเกตพบว่าเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ได้มีการเตรียม magnetized เซลล์เม็ดเลือดแดงจากตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตด้วยน้ำยา Bromeline และ Magnelys ในขั้นตอนตรวจ cell grouping จึงได้ทำการศึกษาวิธีการ magnetized เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A และ B ที่ใช้สำหรับการตรวจ ABO serum grouping ในการตรวจหมู่โลหิต ABO ด้วยเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 เพื่อใช้ทดแทน Hemalys A1, B ในกรณีที่เกิดปัญหาการขนส่งล่าช้าหรือกรณีพบปัญหาด้านคุณภาพของ Hemalys A1, B โดยทำการศึกษาวิธีการเตรียมเซลล์ ระยะเวลาในการเตรียม ความคงทนของเซลล์ และการประเมินประสิทธิภาพของ A และ B magnetized red cells

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิต ณ ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ สภากาชาดไทย ที่เหลือจากการตรวจหมู่โลหิตด้วยเครื่อง Qwalys 3 จำนวน 398 ราย

วัสดุ

1. เม็ดเลือดแดงเข้มข้นในผู้บริจาคโลหิตหมู่โลหิต A และ B ที่เกิดปฏิกิริยา 4+ กับ anti-A และ anti-B ตามลำดับ จำนวนหมู่โลหิตละ 3 ราย
2. Antisera ที่ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้แก่ anti-A และ anti-B เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
3. 0.9% Normal saline solution (0.9% NSS)
4. Magnelys ประกอบด้วยผงแม่เหล็กในสารละลายสำหรับ magnetized red cells บริษัท Diagast, ประเทศฝรั่งเศส
5. Bromeline ความเข้มข้น 2,600 UI/L บริษัท Diagast, ประเทศฝรั่งเศส
6. Alserver's solution ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ
7. Low ionic strength solution (LISS) ผลิตโดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ
8. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งใช้ K3EDTA ความเข้มข้น 1.8 g/L และ 3.6 g/L

9. Hemalys A1, B บริษัท Diagast, ประเทศฝรั่งเศส
10. ตัวอย่างสำหรับควบคุมคุณภาพภายในสำหรับการตรวจหมู่โลหิตด้วยเครื่อง Qwalys 3 หมู่โลหิต O และ AB (HEMA CQI) บริษัท Diagast, ประเทศฝรั่งเศส
11. หลอดทดลองขนาด 12×75 มม.
12. ขวดสำหรับใส่ magnetized red cells
13. เครื่องปั่นล้างเซลล์ บริษัท Diamed ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
14. Rotator VRN-200 บริษัท GEMMY ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
15. นาฬิกาจับเวลา
16. เครื่องปั่นตกตะกอน KOKUSAN รุ่น H-3G บริษัท Kokusan ประเทศญี่ปุ่น
17. เครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 บริษัท Diagast, ประเทศฝรั่งเศส

วิธีการ

1. ศึกษาวิธีการเตรียม magnetized red cells ที่เหมาะสม สำหรับตรวจหมู่โลหิต serum grouping ด้วยเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3

นำเซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A และ B ที่มีประวัติคัดกรองแอนติบอดีเป็นลบและทำปฏิกิริยา 4+ กับน้ำยา anti-A และ anti-B ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จำนวนอย่างละ 3 ราย รายละ 500 ไมโครลิตรมารวมกันตามหมู่โลหิต ปั่นล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย 0.9% NSS จัดเตรียมขวดสำหรับเตรียม magnetized red cells หมู่โลหิต A และ B จำนวน 7 ชุดโดย label เป็นวิธี A-G นำเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่ผ่านการล้างแยกตามหมู่โลหิต 80 ไมโครลิตรรวมกับ Magnelys 1,920 ไมโครลิตร เติมลงในขวดวิธี A-F และเม็ดเลือดแดงเข้มข้นที่ผ่านการล้าง 80 ไมโครลิตรรวมกับ Magnelys 960 ไมโครลิตร ลงในขวดวิธี G นำไปเขย่าบน rotator เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสาร Bromeline ลงในขวดวิธี A เติม Alserver's solution ลงในขวดวิธี B เติม 0.9% NSS ลงในขวดวิธี C และเติม LISS ลงในขวดวิธี D อย่างละ 6,000 ไมโครลิตร ส่วนขวดวิธี E เติม Alserver's solution 5,500 ไมโครลิตร และ 1.8 g/L EDTA 500 ไมโครลิตร ขวดวิธี F เติม 0.9% NSS 5,500 ไมโครลิตร และ 1.8 g/L EDTA 500 ไมโครลิตร และขวดวิธี G เติม Alserver's solution 8,320 ไมโครลิตร และ 3.6 g/L EDTA 500 ไมโครลิตร (Table 1) หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 60 นาที เมื่อครบเวลานำ magnetized red cells หมู่โลหิต A และ B ที่เตรียมได้จากวิธี A-G ไปใช้ตรวจ ABO serum grouping กับพลาสมาหมู่โลหิต A, B, O และ AB อย่างละ 12 ราย ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 บันทึกผลปฏิกิริยาที่เครื่องสรุปแบ่งเป็น 0, ? (w), 1+, 2+, 3+ และ 4+

2. ประเมินระยะเวลาในการเตรียม magnetized red cells ที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้งาน

คัดเลือกวิธีการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมจากการศึกษาที่ 1 ที่ให้ความแรงของปฏิกิริยาเท่ากับ 4+ ทั้ง A cells และหรือ B cells เมื่อทดสอบกับพลาสมาตัวอย่างหมู่โลหิต A, B, O และความแรงของปฏิกิริยาเท่ากับ 0 ทั้ง A cells และ B cells เมื่อทดสอบกับพลาสมาหมู่โลหิต AB ทำการเตรียมเซลล์หมู่โลหิต A cells และ B cells ตามวิธีที่เหมาะสมนำมาใช้ตรวจ ABO serum grouping กับพลาสมาหมู่โลหิต O และ AB อย่างละ 12 ราย ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ณ เวลาที่ 0, 1, 2, 3, 4, ..., 8 และ 24 ชั่วโมง หลังการเตรียม บันทึกผลปฏิกิริยาที่เครื่องสรุปได้

Table 1 Different methods for preparing magnetized red cells

Method	Magnelys (μL)	Red cells (μL)	Bromeline (μL)	Alserver (μL)	NSS (μL)	LISS (μL)	EDTA (μL)
A	1,920	80	6,000	0	0	0	0
B	1,920	80	0	6,000	0	0	0
C	1,920	80	0	0	6,000	0	0
D	1,920	80	0	0	0	6,000	0
E	1,920	80	0	5,500	0	0	500
F	1,920	80	0	0	5,500	0	500
G	960	80	0	8,320	0	0	500

Concentration of red blood cells in method A - F is 1% and method G is 0.5%

Concentration of EDTA in method E is 1.8 g/L and method G is 3.6 g/L

3. การศึกษาความคงทน (stability) ของ magnetized red cells

เตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง A cells และ B cells ที่ถูก magnetized วิธีเดียวกับการศึกษาที่ 2 เพื่อศึกษาความคงทน โดยทดสอบ ABO serum grouping กับพลาสมาหมู่โลหิต O และ AB อย่างละ 4 ราย ทำซ้ำ 3 ครั้งด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ณ วันที่ 0, 1, 2, ... และ 7 หลังการเตรียม และประเมินลักษณะของ magnetized red cells โดยสังเกตด้วยตา เช่น การปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ การแตกของเม็ดเลือดแดงก่อนใช้งาน

4. การประเมินประสิทธิภาพ magnetized red cells ที่เตรียม เปรียบเทียบกับ Hemalys A1, B

เตรียม magnetized red cells ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 1, 2 และการศึกษาที่ 3 นำไปทดสอบ ABO serum grouping ในตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจคัดกรองหมู่โลหิตประจำวันด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 จำนวน 398 ราย เปรียบเทียบระหว่าง magnetized red cells ที่เตรียมใช้เองกับ Hemalys A1, B หากพบตัวอย่างที่ให้ผล discrepancy ระหว่าง cell grouping กับ serum grouping ต้องนำตัวอย่างนั้นมาตรวจซ้ำด้วยวิธีหลอดทดลองเพื่อสรุปผล

การวิเคราะห์ข้อมูล

การแปลผล เครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ทำการถ่ายภาพปฏิกิริยาที่เกิดในไมโครเพลท และซอฟแวร์ประมวลผลจากระยะห่างระหว่างขอบของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตกตะกอนเป็นลักษณะเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมถึงขอบของปฏิกิริยา รวมถึงความคมชัดของรูปที่ถ่ายได้ สรุปเป็นเกรดของปฏิกิริยา 0, ? (w), 1+, 2+, 3+ และ 4+ (Figure 1) และนำมาบันทึกผลเป็นคะแนน (score) ดังนี้ 4+ = 12 คะแนน 3+ = 10 คะแนน 2+ = 8 คะแนน 1+ = 5 คะแนน และ ? (w) = 2 คะแนน ซึ่งวิธีที่เหมาะสมคือวิธีที่ได้คะแนนรวมสูงสุดในการใช้ทดสอบกับพลาสมาที่มี anti-A และหรือ anti-B และได้คะแนนต่ำสุดเมื่อใช้ทดสอบกับพลาสมาที่ไม่มี anti-A และหรือ anti-B

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สถิติเชิงพรรณนา และเปรียบเทียบผลการศึกษาโดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS (Version 19, SPSS Inc., Chicago, L, IL, USA.)

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย ให้ไว้ ณ วันที่ 16 มีนาคม พ.ศ. 2561 เลขที่ NBC 6/2018

ผลการศึกษา

จากการศึกษาเพื่อหาวิธีการเตรียม magnetized red cells ที่เหมาะสมโดยนำมาใช้ทดสอบ ABO serum grouping กับพลาสมาหมู่โลหิต A, B, O และ AB พบว่าการเตรียม A magnetized red cells ด้วยวิธี A ถึง G มีคะแนนรวมเป็น 246, 288, 282, 78, 282, 288 และ 276 ตามลำดับ การเตรียม B magnetized red cells ด้วยวิธี A ถึง G มีคะแนนรวมเป็น 234, 177, 168, 24, 102, 288 และ 288 ตามลำดับ โดยไม่พบปฏิกิริยาที่เป็นผลบวกปลอมและผลลบปลอมในแต่ละหมู่โลหิต ดังนั้นการเตรียม magnetized red cells ด้วยวิธี F และ G จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมและพบว่า วิธี F คะแนนรวมใน cell A และ B สูงที่สุด รองลงมาคือ วิธี G (Table 2)

เมื่อนำ magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F และ G มาทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต O พบว่า cell A และ B ที่เตรียมด้วยวิธีทั้ง 2 ทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต O ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 โดย magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F มีคะแนนรวมเป็น 144/144 (เกิดปฏิกิริยา 4+) ใน cell A และ B ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2, 3, 4,..., 8 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่เตรียมด้วยวิธี G มีคะแนนรวมเป็น 144/144 (เกิดปฏิกิริยา 4+) ใน cell A และ B ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต AB พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาทั้ง 2 วิธี ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียม magnetized red cells ด้วยวิธี F และ G ก่อนใช้งานคือ 2 และ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ (Table 3)

ผลการทดสอบความคงทน (stability) ของ magnetized red cells พบว่า magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F และ G

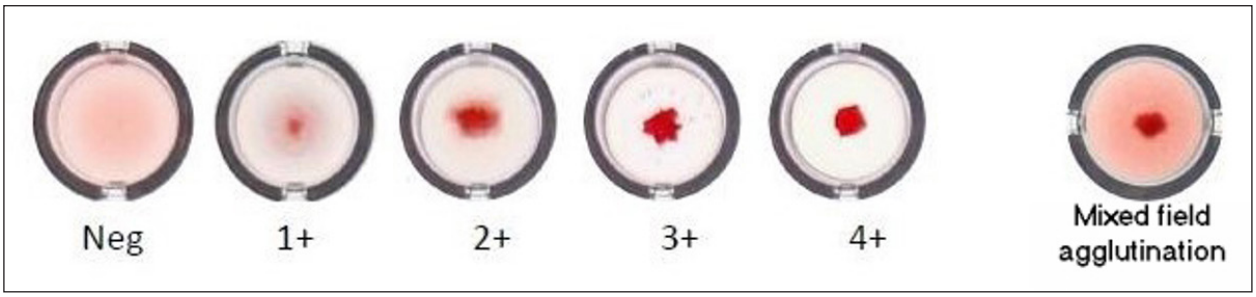

Figure 1 Reaction of blood grouping by Qwalys 3

Table 2 Score of reaction for ABO serum grouping with different magnetized red cells in plasma group A, B, O and AB

Method	Plasma Group A (n = 12)		Plasma Group B (n = 12)		Plasma Group O (n = 12)		Plasma Group AB (n = 12)		Total	
	A cells	B cells	A cells	B cells	A cells	B cells	A cells	B cells	A cells	B cells
A	0	138	138	0	108	96	0	0	246	234
B	0	96	144	0	144	81	0	0	288	177
C	0	132	138	0	144	36	0	0	282	168
D	0	18	24	0	54	6	0	0	78	24
E	0	66	144	0	138	36	0	0	282	102
F	0	144	144	0	144	144	0	0	288	288
G	0	144	144	0	132	144	0	0	276	288

Score of reaction : 4+ = 12, 3+ = 10, 2+ = 8, 1+ = 5 and weak = 2

Table 3 Score of reaction for ABO serum grouping with magnetized red cells by method F and method G in plasma group O and AB at 1, 2, 3,...,8 and 24 hour

Time	Method F				Method G			
	Plasma group O (n = 12)		Plasma group AB (n = 12)		Plasma group O (n = 12)		Plasma group AB (n = 12)	
	A cells	B cells	A cells	B cells	A cells	B cells	A cells	B cells
Hr 0	132	132	0	0	132	132	0	0
Hr 1	134	132	0	0	132	136	0	0
Hr 2	144	144	0	0	142	132	0	0
Hr 3	144	144	0	0	144	144	0	0
Hr 4	144	144	0	0	140	140	0	0
Hr 5	144	144	0	0	140	140	0	0
Hr 6	144	144	0	0	144	140	0	0
Hr 7	144	144	0	0	144	144	0	0
Hr 8	144	144	0	0	144	144	0	0
Hr 24	144	144	0	0	144	144	0	0

Score of reaction : 4+ = 12, 3+ = 10, 2+ = 8, 1+ = 5 and weak = 2

จากการสังเกตด้วยตาไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพและการแตกของเม็ดเลือดแดงใน 7 วันโดยการเตรียมด้วยวิธี F เมื่อทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต O มีคะแนนรวมของ cell A และ cell B ในวันที่ 0 เป็น 136/130 ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 7 เป็น 144/144 โดยไม่พบผลบวกปลอมเมื่อทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต AB ทั้ง A magnetized red cells และ B magnetized red cells ส่วนการเตรียมด้วยวิธี G พบ A magnetized red cells ในวันที่ 0 มีคะแนนรวมเป็น 136 และวันที่ 1-7 มีคะแนนรวมเป็น 144 ในขณะที่ B magnetized red cells ตั้งแต่วันที่ 0-2 มีคะแนนรวมเป็น 134 และวันที่ 3-7 คะแนนรวมลดลงเป็น 132 โดยไม่พบผลบวกปลอมเมื่อทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต AB เช่นเดียวกัน ดังนั้นการเตรียม magnetized red cells ด้วยวิธี F มีความคงทนและความคงที่ของปฏิกิริยามากกว่าวิธี G ใน 7 วัน (Table 4)

ใน Table 5 ผลการประเมินประสิทธิภาพของ magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F เปรียบเทียบกับ Hemalys A1, B พบว่าเมื่อใช้เซลล์ Hemalys A1, B ในการตรวจ ABO serum grouping เครื่องตรวจ Qwalys 3 สามารถสรุปผลหมู่โลหิตได้เป็น A, B, O และ AB และสรุปผลหมู่โลหิตไม่ได้ จำนวน 70, 144, 138, 40 และ 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.59, 36.18, 34.67,

Table 4 Score of reaction for ABO serum grouping with magnetized red cells by method F and method G in plasma group O and AB at day 0-7

Day	Method F					Method G				
	Characteristic	Plasma group O (n = 12)		Plasma group AB (n = 12)		Characteristic	Plasma group O (n = 12)		Plasma group AB (n = 12)	
		A cells	B cells	A cells	B cells		A cells	B cells	A cells	B cells
0	Pass	136	130	0	0	Pass	136	134	0	0
1	Pass	144	144	0	0	Pass	144	134	0	0
2	Pass	144	140	0	0	Pass	144	134	0	0
3	Pass	144	144	0	0	Pass	144	132	0	0
4	Pass	144	144	0	0	Pass	144	132	0	0
5	Pass	144	144	0	0	Pass	144	132	0	0
6	Pass	144	144	0	0	Pass	144	132	0	0
7	Pass	144	144	0	0	Pass	144	132	0	0

Characteristic: Pass : no microbial contamination and no hemolysis of red blood cells
Not pass : found microbial contamination and/or found hemolysis of red blood cells

Table 5 ABO serum grouping detected by Qwalys 3 compared between magnetized red cells (method F) and Hemalys A1, B

Blood group	Hemalys A1, B		Method F	
	N	Percent	N	Percent
A	70	17.59	69	17.34
B	144	36.18	141	35.43
O	138	34.67	136	34.17
AB	40	10.05	40	10.05
Discrepancy	6	1.51	12	3.02
Total	398	100.0	398	100.0

10.05 และ 1.51 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วย magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F พบว่าสามารถสรุปผลเป็นหมู่โลหิต A, B, O และ AB และสรุปผลหมู่โลหิตไม่ได้ จำนวน 69, 141, 136, 40 และ 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.34, 35.43, 34.17, 10.05 และ 3.02 ตามลำดับ โดยพบตัวอย่างที่ไม่สามารถสรุปผลหมู่โลหิตได้ 6 รายสอดคล้องกันทั้งการใช้เซลล์ Hemalys A1, B และ magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F ผลไม่สอดคล้องกันจำนวน 6 รายที่ไม่สามารถสรุปได้โดยใช้ magnetized red cells ที่เตรียมด้วยวิธี F แบ่งเป็นพบผลบวกปลอม 3 ราย เกิดปฏิกิริยาใน A magnetized red cells 1 ราย และ B magnetized red cells 2 ราย และพบผลลบปลอม 3 รายใน A magnetized red cells 2 ราย และ B magnetized red cells 1 ราย ดังนั้นการเตรียม magnetized red cells ด้วยวิธี F มีค่าความถูกต้องร้อยละ 98.49 และค่าความแม่นยำร้อยละ 99.23 เมื่อเทียบกับการใช้ Hemalys A1, B

วิจารณ์

จากการศึกษาการเตรียม magnetized red cells ด้วยสารต่างๆ พบว่าการเตรียมโดยใช้ Bromeline (วิธี A) ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับการตรวจ ABO cell grouping ด้วยเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ในอัตราส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดง 10 ไมโครลิตร Magnelys 240 ไมโครลิตร ตามด้วย Bromeline 750 ไมโครลิตร[12] ซึ่งทางผู้วิจัยได้เตรียมสัดส่วนนี้สำหรับการตรวจ ABO serum grouping แต่ได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจาก Bromeline เป็น proteolytic enzyme ผลิตจากสับปะรดทำหน้าที่ย่อย polypeptide บริเวณ sialic acid ที่มีประจุลบ เมื่อมีประจุลบ

ลดลง แรงผลักระหว่างเม็ดเลือดแดงน้อยลงทำให้ระยะห่างระหว่างเม็ดเลือดแดงลดลง[13,14] โดยการนำไปใช้ต้องคำนึงถึงระยะเวลาเนื่องจากหากเตรียมไว้นานอาจทำให้แอนติเจนต่างๆ ถูกย่อยจนปฏิกิริยาที่เกิดไม่ดีเท่าที่ควรซึ่งการตรวจ ABO cell grouping ด้วยเครื่อง Qwalys 3 ใช้ระยะเวลาในการ incubate ระหว่างเซลล์ผู้บริจาคกับ Bromeline ไม่นานก่อนนำไปใช้ตรวจ แต่การตรวจ serum grouping จะใช้เวลา incubate นานกว่าก่อนนำไปใช้ตรวจ นอกจากนี้การใช้งาน Bromeline ยังต้องคำนึงถึง pH ช่วงที่เหมาะสมคือ 5.4-5.8[15] และระดับความเข้มข้นซึ่ง L.E. Rookard ได้ศึกษาหาระดับความเข้มข้นของ Bromeline ในการเตรียมเซลล์เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน A และ B พบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือร้อยละ 0.25[16] นอกจากนี้ Bromeline ยังก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่อ mucous membrane ของตาและจมูกในการศึกษาอีกด้วย สำหรับ LISS (วิธี D) ซึ่งเป็นสารที่ลดประจุรอบเซลล์ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้นมีข้อควรระวังของการใช้คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการ incubate ถ้านานเกินไปทำให้ความไว (sensitivity) ลดลงอย่างรวดเร็ว รวมถึงอัตราส่วนระหว่างเซลล์ ถ้าไม่เหมาะสมจะทำให้รายงานผลผิดพลาดได้[17,18] จึงพบว่าการใช้ Bromeline และ LISS ไม่เหมาะสมต่อการเตรียมเซลล์สำหรับใช้เป็นระยะเวลานานเนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลาซึ่งส่งผลกระทบต่อการตรวจดังกล่าว การเตรียมเซลล์โดยใช้ 0.9% NSS และ Alserver's solution (วิธี B และ C) พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดมี hemolysis ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการอ่านปฏิกิริยาของเครื่อง Qwalys 3 ทำให้ซอฟแวร์ของเครื่องสรุปผลได้ค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น จึงได้เติม EDTA (วิธี E และ F) ซึ่งเป็นสารป้องกันการเกิด hemolysis โดยใน 0.9% NSS ได้เติม EDTA ที่ระดับความเข้มข้น 1.8 g/L พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดทั้งใน cell A และ B เกิดปฏิกิริยา 4+ แต่ใน Alserver's solution ยังคงพบ hemolysis ที่เกิดใน cell A ผู้วิจัยจึงได้เพิ่มระดับความเข้มข้นของ EDTA เป็น 3.6 g/L และลดระดับความเข้มข้นของเซลล์ลง (วิธี G) เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดในไมโครเพลทเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบปฏิกิริยามีแนวโน้มเกิดผลบวกปลอม โดยพบว่าหลังจากเปลี่ยนระดับความเข้มข้นและปริมาตรของสารต่างๆ แล้วปฏิกิริยาที่เกิดใน cell A และ cell B ไม่พบ hemolysis มีคะแนนเท่ากับ 276 และ 288 ตามลำดับ

การประเมินระยะเวลาในการเตรียม magnetized red cells ที่เหมาะสมก่อนการใช้งาน เป็นการประเมินระยะเวลาในการทำให้เม็ดเลือดแดงมีความเป็นแม่เหล็ก ด้วยการใช้ magnetic bead ที่อยู่ในน้ำยา Magnelys ผสมกับเม็ดเลือดแดงจากนั้นเม็ดเลือดแดงจะดูดซับแม่เหล็กเกาะติดบนผิวเซลล์ (Figure 2) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญเนื่องจากถ้าเม็ดเลือดแดงมีผงเหล็กเกาะติดที่มากพอ จะช่วยให้แม่เหล็กดูดเม็ดเลือดแดงที่มีผลแม่เหล็กตกลงสู่ก้นหลุมไมโครเพลทได้ดีขึ้นแทนการปั่นตกตะกอนเพื่ออ่านปฏิกิริยา พบว่าการเตรียมด้วยวิธี F ใช้เวลา 2 ชั่วโมง และวิธี G ใช้เวลา 7 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน ปฏิกิริยาจึงเกิดได้สมบูรณ์ สาเหตุเกิดจากวิธี G นั้นใช้ปริมาณของ Magnelys น้อยกว่าวิธี F จึงอาจทำให้ต้องใช้เวลานานกว่าที่ผงแม่เหล็กจะเกาะบนผิวของเม็ดโลหิตแดงจนถึงจำนวนที่เหมาะสม

การศึกษาความคงทน (stability) หรืออายุการใช้งานของ magnetized red cells ด้วยวิธี F และ G พบว่าเซลล์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ และไม่พบการแตกของเม็ดเลือดแดงตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 7 การเตรียมด้วยวิธี F เป็นการเตรียมใน 0.9% NSS ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Denesiuk L. และคณะ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกเก็บรักษาใน 0.9% NSS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ 10 วัน[19] ส่วนการเตรียมด้วยวิธี G เป็นการเตรียมใน Alserver's solution เป็นน้ำยาที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติใช้สำหรับเตรียมผลิตน้ำยาเซลล์ต่างๆ ซึ่งเก็บรักษาได้ 40 วัน นับจากวันเจาะเก็บโลหิตนั้น[20] โดยทั้ง 2 วิธียังคงทำปฏิกิริยากับพลาสมาหมู่โลหิต O และ AB ได้โดยไม่พบปฏิกิริยาผลบวกและลบปลอม ทั้งนี้ ทางผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษาจำนวนวันมากกว่านี้จนถึงวันที่เซลล์ที่เตรียมเสื่อมสภาพ เนื่องจากวัตถุประสงค์การวิจัยเป็นการเตรียมเซลล์เพื่อชดเชย Hemalys A1, B เป็นการชั่วคราว และเป็นที่ทราบดีว่าในการทดสอบทางซีโรโลซีนั้น เซลล์ที่เตรียมขึ้นใหม่แอนติเจนต่างๆ บนผิวเซลล์จะมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่มีกว่าเซลล์เก่า ดังนั้นการเตรียมเซลล์ใหม่เพื่อใช้ในการทดสอบจึงดีกว่าการใช้เซลล์เก่า อีกทั้งวิธีการเตรียมเซลล์ที่ได้จากการศึกษานี้เป็นวิธีการเตรียมที่ง่าย ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถเตรียมใหม่เพื่อให้ในการทดสอบได้ในทุกสัปดาห์ได้

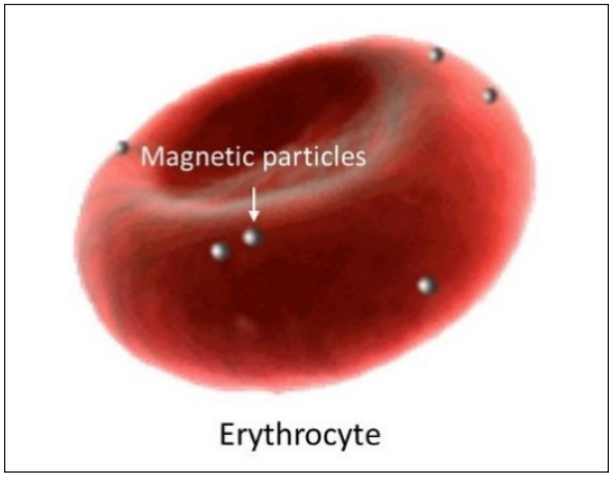

Figure 2 Magnetic particles coated on red blood cells

การประเมินประสิทธิภาพ magnetized red cells ที่เตรียมโดยวิธี F เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Hemalys A1, B พบว่า วิธี F เกิดปฏิกิริยาผลลบปลอม 3 ราย และผลบวกปลอม 3 ราย ใน 3 รายที่พบปฏิกิริยาผลลบปลอมเป็นหมู่โลหิต O 2 ราย และ B 1 ราย ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีหลอดทดลองพบว่า หมู่โลหิต O เกิดปฏิกิริยาเป็น partial hemolysis ซึ่งเป็นรายที่น่าจะมี complement ในปริมาณสูง ถึงแม้มีการเติม EDTA แต่ยังคงไม่เพียงพอ ในขณะที่หมู่โลหิต B เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีหลอดทดลอง พบว่าเกิดปฏิกิริยา 1+ ที่ cell A สรุปเป็นผู้บริจาคโลหิตมี anti-A ในปริมาณต่ำ สำหรับใน 3 รายที่พบปฏิกิริยาผลบวกปลอมเป็นหมู่โลหิต A 1 ราย และ B 2 ราย เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธีหลอดทดลองพบเกิดปฏิกิริยา weak กับ standard pool O cells ดังนั้นปฏิกิริยาผลบวกปลอมอาจเป็นผลจากแอนติบอดีอื่นๆ ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง cell A และ cell B ซึ่งในขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ที่นำมาเตรียม magnetized red cells นั้นไม่มีการตรวจหาแอนติเจนอื่นๆ มีเพียงการตรวจสอบประวัติการคัดกรองแอนติบอดีเท่านั้น ดังนั้นจึงควรคัดเลือกเซลล์ที่จะนำมาเตรียมเป็น magnetized red cells ต้องเป็นเซลล์ที่ไม่มีแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่มีความชุกในประชากรไทย เช่น Mi^a, Le^a, Le^b, P1, E และ c เป็นต้น[21] ซึ่งทั้ง 6 รายที่พบปฏิกิริยาผลบวกปลอมและลบปลอม เครื่องตรวจวิเคราะห์หมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ไม่สรุปหมู่โลหิตเนื่องจากไม่สอดคล้องกันของผลระหว่าง cell grouping และ serum grouping ซึ่งผู้ทำการทดสอบจำเป็นต้องตรวจยืนยันต่อด้วยวิธีหลอดทดลอง

สรุป

การตรียม magnetized red cells ด้วยการเติมเม็ดเลือดแดง 80 ไมโครลิตร รวมกับ Magnelys 1,920 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบน rotator นาน 10 นาที จากนั้นเติม 0.9% NSS 5,500 ไมโครลิตร และ 1.8 g/L EDTA 500 ไมโครลิตร เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการใช้ตรวจ ABO serum grouping ด้วยเครื่องตรวจหมู่โลหิตอัตโนมัติ Qwalys 3 ซึ่งต้องทำการเตรียมก่อนใช้งานเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และความคงทนของ magnetized red cells สามารถใช้งานได้ดีอย่างน้อย 7 วัน โดยมีค่าความถูกต้องร้อยละ 98.49 และค่าความแม่นยำร้อยละ 99.23

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำการศึกษาวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์ สภากาชาดไทย ที่ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณสภากาชาดไทยที่ได้ให้งบประมาณสำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. *Jain A, Kaur R. Hemovigilance and blood safety. Asian J Transfus Sci. 2012;6:137-8.*
2. *Sahu S, Hemlata, Verma A. Adverse events related to blood transfusion. Indian J Anaesth. 2014;58:543-51.*
3. *Strobel E. Hemolytic Transfusion Reactions. Transfus Med Hemother. 2008;35:346-53.*
4. *Suddock JT, Crookston KP. Transfusion Reactions. [Updated 2019 Feb 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482202/.*
5. *Sazama K. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. Transfusion. 1990;30:583-90.*
6. *Chiewsilp P. Hemolytic transfusion reaction. J Hematol Transfus Med. 2005;15:265-70.*
7. *Das SS, Charkrabarty R, Zaman RU. Monitoring errors in a blood bank immunohematology laboratory: Implementing strategies for safe blood transfusion. Glob J Transfus Med. 2017;2:118-23.*
8. *Bejrachandra S, Chongkolwatana V, Permpikul P, Siriboonrit U, Chandanayingyong D. Transfusion reported errors at Siriraj Hospital. J Hematol Transfus Med. 2000;10:7-15.*
9. *National Blood Centre, Thai Red Cross Society. National blood policy 2010. 1st ed. Bangkok Udomsuksa; 2010.*
10. *Bouix O, Ferrera V, Delamaire M, Redersdorff JC, Roubinet F. Erythrocyte-magnetized technology: an original and innovative method for blood group serology. Transfusion. 2008;48:1878-85.*
11. *E for L international CO. L. Standard operation procedure for Qwalys 3 analyzer. 2014.*
12. *Schoenfeld H, Bulling K, Von Heymann C, Neuner B, Kalus U, Kiesewetter H, et al. Evaluation of immunohematologic routine methods using the new erythrocyte-magnetized technology on the QWALYS 2 system. Transfusion. 2009;49:1347-52.*
13. *Bejrachandra S. Enzyme. Thai J Hematol transfus Med. 1999;9:99-101.*
14. *Pirofsky B, Mangum MEJ. Use of bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies. Proc Soc Exp Biol Med. 1959;54:640-9.*
15. *Scott ML, Johnson CA, Phillips PK. The pH optima for papain and bromelain treatment of red cells. Vox Sang. 1987;52:223-7.*
16. *Rookard, L.E., Edmondson, O. and Greenwell. ABO reverse grouping: effect of varying concentrations of the enzyme bromelain. Br J Biomed Sci. 2009;66:93-7.*
17. *Lown JA, Barr AL, Davis RE. Use of low ionic strength saline for crossmatching and antibody screening. J Clin Pathol. 1979;32:1019-24.*
18. *Wicker B and Wallas CH. A comparision of a low ionic strength saline medium with routine methods for antibody detection. Transfusion. 1976;16:469-72.*
19. *Denesiuk L, Clarke G. Use of red blood cells stored in saline suspension for immediate spin crossmatch. Lab Hematol. 2006;12:156-9.*
20. *Sakuldamrongpanitch T. The reagent red cell for preparation of screening and panel cells. J Hematol Transfus Med. 2013;2:155.*
21. *Nathalang O, Kuvanont S, Punyaprasiddhi P, Tasaniyanonda C, Sriphaisal T. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2001;32:204-7.*