

การศึกษานำร่องวิธีการเตรียมน้ำยา Coombs Control Cells จากตัวอย่างเลือดใหม่ เพื่อใช้ในการตรวจประจำวันทางห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด

พลวรรต ทองสุข¹ วรพรรณ ยิ่งศิวัชพัฒน์¹ สุพัตรา พูนขุนทด² กิตติพงษ์ มาตรสันต์²

รับบทความ: 17 เมษายน พ.ศ. 2565/ แก้ไขบทความ: 21 มิถุนายน พ.ศ. 2565/ ตอรับบทความ: 23 มิถุนายน พ.ศ. 2565

บทคัดย่อ

ในงานตรวจประจำวันทางธนาคารเลือดที่มีการตรวจความเข้ากันของเลือดสำหรับหาโลหิตที่เข้าได้กับผู้ป่วยและการตรวจวินิจฉัยโรค Hemolytic Disease ที่เกิดจากสาเหตุต่าง ๆ ซึ่งจำเป็นต้องใช้ Coombs Control Cells (CCC) เป็นเซลล์ควบคุมคุณภาพของการตรวจ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อทดลองเตรียม IgG sensitized Red Blood Cells ไว้ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ anti-D ชนิด IgG และเปรียบเทียบกับเซลล์มาตรฐานจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ เริ่มจากนำ fresh blood Group O Rh(D) positive มาปั่นล้างและเตรียมเป็น 10% Pack Red Cells (PRC) ในน้ำเกลือ จากนั้น sensitized โดยการเจือจางน้ำยา anti-D สองเท่าตามลำดับตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:512 แล้วหยด 10% PRC ลงไปในหลอด anti-D ทุก dilution เขย่าและปั่นอ่านผลที่อุณหภูมิห้องหรือ 25 องศาเซลเซียส เพื่อหาไตเตอร์ที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นนำ sensitized RBC ไปทดสอบกับ Anti-Human Globulin (AHG) โดยวิธี Direct Antiglobulin Test (DAT) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ CCC ที่เตรียมใช้เองผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยา AHG ด้วยวิธี standard tube test ที่ 37 องศาเซลเซียส กับ sensitized RBC ที่เตรียมได้ พบว่าสามารถให้ปฏิกิริยาที่ชัดเจนและอ่านค่าการจับกลุ่มได้มากกว่าการทดสอบที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งปฏิกิริยาแสดงให้เห็นได้แม้มีการเจือจางน้ำยา AHG ในระดับ 1:128 ยังคงให้ผลบวก ซึ่งแสดงว่า sensitized RBCs ที่เตรียมได้ในการศึกษานี้มีคุณภาพดีเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ CCC จากสภากาชาดไทยที่ทำปฏิกิริยากับ AHG พบว่าอ่านความแรงของปฏิกิริยาได้ไม่ต่างกันและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้ยังมีการใช้งานได้นานถึง 15 วันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงทำให้ sensitized RBCs ที่เตรียมมีความเหมาะสมอาจนำมาใช้แทน CCC มาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้

คำสำคัญ: การเตรียมน้ำยา Coombs Control Cells, IgG, ตัวอย่างเลือดใหม่, งานตรวจประจำวัน

¹อาจารย์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา

²นักศึกษา สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา

*ผู้รับผิดชอบบทความ Email: vorraphun@nmc.ac.th Tel: 0867892262

Coombs Control Cells Preparation from Fresh Blood for Routine Use in Blood Bank Laboratory: A Pilot Study

Pollawat Thongsuk¹ Vorraphun Yingsiwaphat^{1*} Kittipong Martsan²
Suphatra Phunkhuntood²

Received: 17 May 2022/ Revised: 21 June 2022/ Accepted: 23 June 2022

Abstract

In routine Blood Bank Laboratory, cross-matching is performed for compatible safe blood and diagnosis of Hemolytic Disease caused by various factors which is necessary to use Coombs Control Cells (CCC) as quality control cells for testing. The aim of this study was to prepare in-house IgG sensitized Red Blood Cells (RBC) by using anti-D (IgG) compared with commercial CCC from National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Taking 2 tubes of 3 ml of Group O Rh(D) positive fresh blood to wash in 0.9% NSS for 3-5 times or until supernatant was clear. Then, removed supernatant and prepare 10% Pack Red Cells (PRC) in NSS. To determine the best titer, two-fold dilution of anti-D solution (1:2 to 1:512) was prepared, then adding 10% PRC to each anti-D tube. The tubes were shaken and spun at room temperature (25°C). Sensitized RBC was tested with Anti-Human Globulin (AHG) by using Direct Antiglobulin Test (DAT) to evaluate effectiveness of in-house CCC. Potency test of prepared sensitized RBC with AHG reagents using standard tube test method at 37°C showed clearer and stronger agglutination than those tests at room temperature. The reaction was positive even with AHG dilution at 1:128. When compared with Thai Red Cross CCC was reacted with AHG, it was found that reactive strength readings were not different and no statistically significant difference ($p>0.05$). It was indicated that sensitized RBC prepared in this study had good quality with a shelf life of 15 days when storage at 4°C before use. The in-house sensitized RBCs may be used as commercial CCC substitution in the laboratory.

Keywords: Coombs Control Cells preparation, fresh blood, IgG sensitized Red Blood Cells, Routine blood bank

¹ Lecturer, Division of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences Nakhon Ratchasima College

² Student, Division of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences Nakhon Ratchasima College

*Corresponding Author, Email: vorraphun@nmc.ac.th Tel: 0867892262

บทนำ

Coombs Control Cells (CCC), IgG sensitized Red Blood Cells (RBC) หรือ ตัวอย่างเลือดที่ให้ผล Direct Antiglobulin Test มีความจำเป็นอย่างมากเพื่อใช้เป็น positive control ในการควบคุมคุณภาพของการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ในงานตรวจประจำวันทางธนาคารเลือดมีการตรวจ cross-matching สำหรับหาโลหิตที่เข้าได้กับผู้ป่วย ซึ่งต้องมีการตรวจถึงขั้น Indirect Antiglobulin Test และสามารถใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรค เช่น Hemolytic Disease of the Newborn (HDN), Hemolytic Transfusion Reaction (HTR), Autoimmune Hemolytic Anemia (AIHA), และภาวะเม็ดเลือดแดงถูก sensitized ด้วยยาบางชนิด ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดลองเตรียม IgG sensitized RBC ไว้ใช้เองในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบกับ CCC มาตรฐานจากศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย ผลจากหลายการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า IgG sensitized RBC สามารถเตรียมได้ในห้องปฏิบัติการงานธนาคารเลือด และมีคณะวิจัยได้เตรียม sensitized RBC โดยใช้เลือดเก่าที่หมดอายุจากโรงพยาบาลซึ่งมีอายุมากกว่า 21-35 วัน มาใช้ในการทดลองก็ยังสามารถเตรียมได้ แต่มีอายุที่สั้นกว่า CCC ที่ซื้อจากสภากาชาดไทย ดังนั้นผู้ศึกษาหากใช้เม็ดเลือดแดงใหม่ (fresh blood) อายุไม่เกิน 3 วันมาใช้ในการเตรียม อาจทำให้มีอายุการใช้งานนานกว่าเม็ดเลือดแดงเก่า และติดตามผลการทดสอบทุก 3 วัน จำนวน 5 ครั้ง เป็นเวลา 15 วัน เพื่อดูปฏิกิริยาว่าสามารถอยู่ได้นานสูงสุดกี่วัน โดยปกติแล้วการทำงานในงานธนาคารเลือดที่ใช้ reagent RBC ปกติหลังจากเตรียมได้เองแล้วจะนำไปใช้ไม่เกิน 3-5 วัน ดังนั้นถ้าผลของการเตรียม IgG sensitized RBC สามารถมีอายุเก็บไว้ใช้ได้นานเกิน 5-7 วัน ได้สำเร็จ ก็ถือว่าการทดลองนี้มีความคุ้มค่าที่จะนำวิธีการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเตรียม IgG sensitized red blood cell ไว้ใช้ในห้องปฏิบัติการได้ เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถนำตัวอย่างเลือดที่ได้มาทำให้เกิดประโยชน์มากที่สุดอีกด้วย

วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อเตรียม IgG sensitized RBC โดยการใช้ยา anti-D ชนิด IgG ในการทำ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดงหมู่เลือด O Rh (D) positive จาก fresh blood ที่มีอายุไม่เกิน 3 วัน (โดยรับอนุมัติโครงการวิจัยคณะกรรมการจริยธรรมเรียบร้อยแล้ว หมายเลขรับรอง NMCEC-0053/2563) การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงเริ่มจากเก็บตัวอย่าง fresh blood Group O Rh(D) positive 3 มล. จากกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี นำมาปั่นล้างด้วย 0.9% Normal Saline Solution (NSS) 3-5 ครั้ง หรือจนกว่าของเหลวส่วนบนใส จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไป ส่วนที่เหลือเป็น PRC และทำการ sensitization เซลล์เม็ดเลือดแดง ต้องทดสอบหา titer ที่เหมาะสม โดยนำ anti-D (IgG) (National Blood Centre Thai Red Cross Society Bangkok, Thailand, Lot No.62014, exp. 7/11/2021) มาเจือจางสองเท่าตามลำดับ (two fold dilution) ด้วย NSS ดังนี้ undiluted, (หลอดที่ 1) 1:2, (หลอดที่ 2) 1:4, (หลอดที่ 3) 1:8, (หลอดที่ 4) 1:16, (หลอดที่ 5) 1:32, (หลอดที่ 6) 1:64, (หลอดที่ 7) 1:128, (หลอดที่ 8) 1:256, และ (หลอดที่ 9) 1:512 นำ 10% PRC ที่เตรียม 50 ไมโครลิตรหยดลงไปทุกหลอดของ anti-D dilution หลังจากนั้นเขย่าและปั่นอ่านที่

อุณหภูมิห้อง การอ่านผลและการรายงานผลการทดสอบอ่านผล ทำโดยเขย่าหลอดทดลองเบาๆ เพื่ออ่านปฏิกิริยา agglutination หากไม่พบปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า ให้สังเกตดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การแจกแจงปฏิกิริยาผลบวกและการให้ค่าคะแนนปฏิกิริยา agglutination เป็นเกรดจาก 0 คือไม่มีการจับกลุ่ม ไปถึง 4+ คือมีการจับกลุ่ม 100% (Roback, Coombs, Grossman, & Hillyer, 2008) และบันทึกผล ต่อมาคัดเลือกปฏิกิริยาที่ให้ผลลบหลอดแรกที่ดีกับหลอดที่ให้ผลบวกหลอดสุดท้ายนำมาใช้งานเป็น dilution ที่เหมาะสมสำหรับการทำ sensitization ที่อุณหภูมิ 37°C ต่อไป เตรียมหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มล. จำนวน 4 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง ดูด PRC ใส่ลงไป หลอดละ 0.5 มล. และเติมซีรัมที่เจือจาง 1:128 จำนวน 2.5 มล. ลงไปในทั้ง 4 หลอด หลังจากนั้นเขย่าและนำไปบ่ม ที่ 37°C เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ ไปปั่นล้าง 3 ครั้ง ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งให้หมด แล้วนำ PRC ที่ได้ ไปทดสอบกับ Anti-Human Globulin (AHG) (National Blood Centre Thai Red Cross Society Bangkok, Thailand, Lot No. 63021, exp. 15/1/2021) โดยวิธี Direct Antiglobulin Test (DAT) เปรียบเทียบกับ Coombs Control Cells มาตรฐานของสภาากาชาด (National Blood Centre Thai Red Cross Society Bangkok, Thailand, Lot No. 65030, exp. 15/7/2021) และการทดสอบความคงตัวของ sensitized RBC ที่เตรียมได้โดยวิธี Direct Antiglobulin Test แบ่ง CCC ที่เตรียมได้ (in-house CCC) เป็น 3 ขวด และ ทำการทดลอง 3 หลอด ต่อ 1 ขวด นำค่าคะแนน agglutination มาเฉลี่ยกัน ทำการบันทึกผลและทำต่อเนื่องในวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 15 จนครบ 5 ครั้ง การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะรายงานค่ากลางของค่าคะแนน agglutination ในรูปค่าเฉลี่ย (mean) และใช้ independent-sample T-Test ($p < 0.05$) การวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าคะแนน agglutination ที่ได้จากการทดสอบ DAT จากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ sensitized ด้วย anti-D ชนิด IgG ในวันเริ่มต้นของการทดสอบ (วันที่ 0) วันที่ 3, 6, 9 และ 15 จนครบ 5 ครั้งของการเก็บเลือด ในรูปค่าเฉลี่ย (mean)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

น้ำยา anti-D ที่นำมาใช้มี potency อยู่ที่ titer ในระดับ 1:128 ซึ่งโดยมาตรฐานแล้ว น้ำยา anti-D ที่ได้มาตรฐานยอมรับได้ตามมาตรฐานสากลคือ มีความแรงมากกว่าหรือเท่ากับ 1:64 และเมื่อนำมา titer ที่เหมาะสมกับ 10% PRC พบว่า ปฏิกิริยาให้ผลลบหลอดแรกที่ดีกับหลอดที่ให้ผลบวกหลอดสุดท้ายเป็น dilution ที่เหมาะสมในการนำมา sensitized ที่อุณหภูมิ 37°C คือ 1:128 ดังที่แสดงในตารางที่ 1 ผลการศึกษานี้มีความแตกต่างกัน กับการวิจัยก่อนหน้านี้ (อังสนา 2562) ซึ่งใช้เลือดที่หมดอายุ 3, 5 และ 7 วัน จากงานธนาคารเลือดของโรงพยาบาล แล้วทำการ sensitized RBCs ด้วย anti-D ที่ทำการเจือจางเรียงลำดับแบบ two fold dilution ได้ผลพบว่าเลือดที่หมดอายุทั้งหมดในวันที่ 0 ให้ผล DAT บวก ตั้งแต่ anti-D ที่ค่าความเจือจาง undiluted -1:32 แสดงว่าการใช้ fresh blood ในการเตรียม CCC ใช้ปริมาณของ anti-D น้อยกว่าถึง 4 เท่า

ตารางที่ 1 ค่าผลคะแนนปฏิกิริยา agglutination ที่ความเจือจางของ anti-D ชนิด IgG ที่อุณหภูมิ 37 °C

Anti-D titer	undiluted	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
ค่าคะแนน										
ปฏิกิริยา agglutination	4+	4+	4+	4+	3+	2+	1+	0	0	0

จากผลการทดสอบ potency ของน้ำยา AHG ด้วยวิธี standard tube test ที่อุณหภูมิห้อง กับ sensitized RBC ที่เตรียมได้ พบว่าเซลล์ที่เตรียมได้ สามารถเกิดได้กับน้ำยา AHG ในระดับเจือจาง titer ที่ 1:32 ที่อุณหภูมิ 25°C หรือ และที่อุณหภูมิ 37°C พบว่าทำปฏิกิริยาได้กับ AHG ที่มี dilution titer ได้มากกว่า 1:128 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่าง CCC ของสภาฯ ชาติไทย กับ CCC ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ ด้วยน้ำยา AHG dilution ที่ให้ผลลบกับเซลล์ที่เตรียมได้ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าให้ผลลบเหมือนกันที่ dilution 1:64 และ 1:256 ที่ 37°C ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2) แสดงว่าคุณภาพของการเตรียมเซลล์ที่ได้ในห้องปฏิบัติการสามารถนำมาใช้เป็น Check cells ในการทำการทดสอบทางธนาคารเลือดได้

ตารางที่ 2 การทดสอบ potency ของน้ำยา anti-Human antiglobulin ด้วยวิธี standard tube test ที่อุณหภูมิห้องและ 37°C กับ sensitized RBC ที่เตรียมได้

อุณหภูมิ	CCC	undiluted	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	ค่า p
25°C	Thai Red Cross	4+	3+	2+	2+	2+	1+	0	0	0	>0.05
	In-house	4+	3+	2+	2+	2+	1+	0	0	0	
37°C	Thai Red Cross	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	>0.05
	In-house	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	

การทดสอบความคงตัวของ sensitized RBC ที่เตรียมได้ทุก ๆ 3 วัน โดยวิธี Direct Antiglobulin Test ทำการบันทึกผลและทำต่อเนื่องในวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 15 จนครบ 5 ครั้ง พบว่าได้ค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยา agglutination ดังต่อไปนี้ 4+, 4+, 3.7+, 3.7+ และ 2.7+ ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่า sensitized RBCs ที่เตรียมสามารถใช้งานได้นานถึง 15 วัน ซึ่งมีระยะเวลาการใช้งานพอกับ CCC ของสภาฯ ชาติไทยที่เป็นเซลล์มาตรฐานและนิยมใช้ในการทำงานประจำวันในห้องปฏิบัติการ และเก็บไว้ใช้ได้ยาวนานกว่าการใช้เลือดที่หมดอายุแล้วมาเตรียมซึ่ง sensitized RBCs จะมีอายุการใช้งานเพียง 3 วันเท่านั้น (อังสนา 2019)

ตารางที่ 3 การทดสอบความคงตัวของ sensitized RBC ที่เตรียมได้

ขวดที่	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 15
1	4+	4+	4+	4+	3+
2	4+	4+	3+	3+	2+
3	4+	4+	4+	4+	3+
ค่าเฉลี่ย	4+	4+	3.7+	3.7+	2.7+

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษานี้สามารถเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญในการเตรียม sensitized RBCs ที่ให้ผล DAT positive โดยใช้ anti-D ชนิด IgG ที่มีค่าความเจือจางเท่ากับ 1:128 มาใช้ในการ sensitization เนื่องจากใช้ fresh blood ในการเตรียมจึงใช้ anti-D ในปริมาณที่น้อยและเมื่อทดสอบความคงตัวพบว่าเซลล์ที่เตรียมสามารถใช้ได้นานถึง 15 วันหลังจากที่เตรียมแล้ว ซึ่งมีอายุการใช้งานใกล้เคียงกับ Coombs Control Cells ของสภาวิชาชีพ นอกจากจะปรับใช้ในงานประจำวันยังสามารถเตรียมเพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการของวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต โดยใช้เลือดส่วนเหลือที่นักศึกษาเจาะจากการเรียนวิชาโลหิตวิทยาซึ่งเป็น fresh blood มาเตรียม sensitized RBCs ซึ่งสามารถช่วยประหยัดงบประมาณในการซื้อเซลล์มาใช้ และเป็นการฝึกทักษะในการเตรียมน้ำยาให้นักศึกษาได้อีกด้วย ข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือ ทำวิจัยในช่วงที่มีสถานการณ์การระบาดของโรค COVID-19 อย่างหนัก มีการประกาศปิดสถานศึกษา จึงทำให้มีเวลาไม่เพียงพอในการทำ elution technique เพื่อแสดงว่า ใน eluate มี แอนติบอดีที่แยกออกมาจากแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดงจริง โดยการทำปฏิกิริยากับ antibody screening cells (O1, O2 cells) เมื่อเติมน้ำยา antihuman globulin แล้วเห็นปฏิกิริยา agglutination ชัดเจน

บรรณานุกรม

1. ดุษฎี ภูริกุล, นุชนาฏ เปรมประยูร, สาริกา เมฆฉาย และอุดม ตั้งต้อ. (2561). ความสัมพันธ์ของผู้บริจาคโลหิตที่มี DAT บวกกับ autoimmune diseases. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย.
2. ปาริชาติ เพ็ญพิกุล. (2561). Direct Antiglobulin Test ที่มีผลบวกในผู้บริจาคเลือด. พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
3. อังสนา โยธินารักษ์. (2562). การเตรียมตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกสำหรับ Direct Antiglobulin Test เพื่อใช้ในการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการในวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยรังสิต. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2562, 26 เมษายน 2562 ณ มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี, น. 64-75.
4. อภิวันท์ พิพัฒน์วิชกุล และคณะ (2559). การตรวจพบ Direct Antiglobulin Test ที่ให้ผลเป็นบวกในโลหิตบริจาคและการตรวจติดตาม ผู้บริจาคโลหิตที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. การประชุมวิชาการงานบริการโลหิตระดับชาติ ครั้งที่ 23 ประจำปี พ.ศ. 2559. ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิต ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย.

5. Silva, C.D., Araújo, R.D., Machado, B.A., Fior, T., Mattiello, J.M., Meinhart, M., Laurenliê, B., Pasqualotti, A., & Lilian Castilho. (2020). Association of positive direct antiglobulin test (DAT) with nonreactive eluate and drug-induced immune hemolytic anemia (D I H A). Transfusion and Apheresis Science. 60(1), pp. 103015.
6. Roback, J.D., Coombs, M.R., Grossman, B.J., and Hillyer, C.D. (2008). Antiglobulin test. Technical manual (16th ed.). Bethesda, Maryland United States: AABB.
7. Samuel R. Theis and Muhammad F. Hashmi. (2021). Coombs Test. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>
8. Zantek, N. D., Koepsell, S. A., Tharp, D. R. and Cohn, C. S. (2012). The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. American Journal of Hematology. 87, pp. 707-709.