

การใช้เทคนิคไมโครเพลทตรวจหาแอนติเจนอาร์เอสดีโดยใช้แอนติ-ดีเจือจาง ทำปฏิกิริยาในน้ำเกลือปกติ

มาลินี มีแสง วท.บ.

คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Microplate Technique for Rh (D) antigen by using diluted anti-D in normal saline medium

Meesaeng, M, B.Sc.

Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

หลักการและเหตุผล: การนำเทคนิคไมโครเพลทมาใช้ในงานทางคลังเลือด ทำให้สามารถตรวจตัวอย่างทดสอบได้ครั้งละเป็นจำนวนมากและใช้น้ำยาปริมาณน้อย ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

วัตถุประสงค์: การศึกษานี้เป็นการใช้เทคนิคไมโครเพลทเพื่อตรวจหาแอนติเจนอาร์เอสดีบนเม็ดเลือดแดงด้วยแอนติซีชนิดเจือจางโดยเปรียบเทียบการทดสอบระหว่างการใช้น้ำเกลือปกติและการใช้เอนไซม์เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาเพื่อลดขั้นตอนในการเตรียมเอนไซม์และประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดสอบ

รูปแบบการศึกษา: เป็นการศึกษาแบบตัดแปลงและเปรียบเทียบ
สถานที่การศึกษา: คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กลุ่มตัวอย่าง: ศึกษาในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างตุลาคม 2539 - พฤษภาคม 2540 จำนวน 11,379 ราย

วิธีการศึกษา: ได้ใช้เทคนิคไมโครเพลทตรวจหาแอนติเจนอาร์เอสดีบนเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบระหว่างการใช้น้ำเกลือปกติและการใช้เอนไซม์เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาโดยใช้แอนติซีซึ่งเจือจางด้วยน้ำเกลือปกติเป็น 1:200 ทำปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้น 1% ด้วยวิธี stick method ในไมโครเพลทรูปตัววีสามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง

ผลการศึกษา: จากการศึกษาพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดสอบตรงกัน จากตัวอย่างทดสอบจำนวน 11,379 ราย ให้ผลแอนติเจนติบวก 11,352 ราย และแอนติเจนติลบ 27 ราย

สรุป: เทคนิคนี้เป็นวิธีที่ง่ายในการตรวจหาแอนติเจนอาร์เอสดีบนเม็ดเลือดแดง ใช้ได้ผลดี มีความถูกต้องแม่นยำ มีความไวและความจำเพาะ 100% เป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมเอนไซม์ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในส่วนของน้ำยา สามารถทำได้พร้อมกันครั้งละเป็นจำนวนมาก เหมาะสำหรับที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการคลังเลือดทั่วไปที่มีปริมาณผู้บริจาคโลหิตจำนวนมาก

Background: Microplate technique is used for routine blood processing in blood bank for mass testing, saving reagents and reducing time.

Objective: The microplate technique is used for detecting Rh (D) antigen on red blood cells by using normal saline solution (NSS) medium in stead of enzyme solution to save the cost of enzyme reagent and reduce processing time.

Design: Laboratory.

Setting: Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Subject: A total of 11,379 blood samples from blood donors who donated blood to the Blood Transfusion Center, during October1996-May1997 were used for the study.

Methods: Microplate Rh-D typing was performed by diluting anti-D in NSS medium in comparison to routine one-stage enzyme technique. One percent approximately of red cell solution was prepared by the stick method in 25 microlitre NSS in a V-type microplate well. Twenty five microlitre of 1:200 diluted anti-D was added. The result was read by the naked eye after incubation at room temperature for one hour.

Results: Both techniques demonstrated concordant results for typing of Rh(D) antigen in all of 11,379 blood samples. There were 11,352 Rh-D positive and 27 Rh-D negative.

Conclusions: This microplate technique is easily performed for detection of Rh(D) antigen without using enzyme reagent. It gives high sensitivity and specificity of 100% and reduces the cost of enzyme reagent and the time for enzyme solution preparation. Therefore, this microplate technique using diluted anti-D in NSS reaction can be used for Rh (D) detection in any blood bank which

คำรหัส: ไมโครเพลท • แอนติเจนอาร์เอสดี

has a large number of blood donors.

Key word: Microplate • Rh(D) antigen.

ศรีนครินทร์เวชสาร 2540; 12(4), 207-211 • Srinagarind Med J 1997; 12(4), 207-211

บทนำ

เนื่องจากหมู่โลหิตอาร์เอสลบ (Rh negative) ในคนไทย มีน้อยมากพบเพียง 0.3% เท่านั้น⁽¹⁾ และมักมีปัญหาเกิดขึ้น เมื่อผู้ป่วยต้องการใช้โลหิตอาร์เอสลบ ทั้งนี้เนื่องจากผู้ที่มีหมู่โลหิตอาร์เอสลบ หากได้รับหมู่โลหิตอาร์เอสบวกเข้าไป ร่างกายจะสร้างแอนติอาร์เอสซึ่งจะทำลายเม็ดเลือดแดง ปฏิกริยาดังกล่าวนี้อาจทำให้ผู้ป่วยมีอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการคลังเลือดทั่วไป จึงควรมีการตรวจหาแอนติเจนดีในระบบอาร์เอส (Rh(D) antigen) เพื่อตรวจหาหมู่โลหิตอาร์เอสบวก (Rh positive) และหมู่โลหิตอาร์เอสลบ (Rh negative) ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้วิธีมาตรฐานหลอดทดลอง⁽²⁾ ต้องใช้น้ำยาแอนติดีซินิดเข้มข้นและมีราคาแพง ใช่วัสดุอุปกรณ์ในการทดสอบจำนวนมาก ต่อมาเมื่อผู้พยายามใช้เทคนิคไมโครเพลทในการทดสอบหาแอนติเจนดีบนเม็ดเลือดแดง⁽³⁻⁶⁾ พบว่ามีความไวสูง สะดวกและประหยัดค่าใช้จ่าย ชาญวิทย์และคณะได้ประยุกต์เทคนิคไมโครเพลทโดยใช้แอนติดีเจ็จจางในอัลบูมินเข้มข้น 3% และใช้เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกริยาขั้นตอนเดียว⁽⁹⁾ (one stage papain technique) ช่วยในการทำปฏิกริยา และสามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปั่นเพลท อมรรรัตน์และคณะได้ประยุกต์เทคนิคไมโครเพลทโดยใช้แอนติดีเจ็จจางในน้ำเกลือปกติเป็น 1:200 และใช้เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกริยาขั้นตอนเดียวช่วยในการทำปฏิกริยา⁽¹⁰⁾ พบว่าได้ผลดีและมีความไวสูงเท่ากับวิธีมาตรฐานหลอดทดลอง แต่เนื่องจากการประยุกต์เทคนิคไมโครเพลททั้งสองวิธีดังกล่าวยังต้องใช้เอนไซม์ปาเปนช่วยในการทำปฏิกริยา เพื่อเป็นการลดขั้นตอนและประหยัดค่าใช้จ่ายในการเตรียมเอนไซม์ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาดัดแปลงใช้น้ำเกลือปกติเป็นตัวกลางแทนสารละลายเอนไซม์ในการทำปฏิกริยา และเปรียบเทียบผลกับวิธีใช้เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกริยาขั้นตอนเดียว⁽¹⁰⁾ พบว่าการตรวจได้ผลดีให้ผลถูกต้อง มีค่าความไวและค่าความจำเพาะ 100% ซึ่งทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย สามารถนำเทคนิคไมโครเพลทนี้ไปใช้ใน ห้องปฏิบัติการคลังเลือดทั่วไปทุกระดับ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ไมโครเพลทรูปตัว V ขนาด 96 หลุม และ microdropper ขนาด 25 ไมโครลิตร

2. ตัวอย่างเลือดทดสอบจากผู้บริจาคโลหิต จำนวน 11,379 ราย

3. น้ำยาที่ใช้ทดสอบ

- 3.1 Anti - D (CSL lot . 01802 Human Monoclonal IgM + IgG)

- 3.2 Anti - D (DIAGAST lot . 028000 Human Monoclonal IgM + IgG)

- 3.3 Anti - D (Bioclone ortho Diagnostic System lot. DB175A Monoclonal-Polyclonal Blend)

4. น้ำเกลือปกติ (Normal Saline Solution)

วิธีการ

1. การปรับมาตรฐานการทดสอบด้วยวิธีไมโครเพลท เพื่อหาอัตราการเจ็จจางที่เหมาะสมของแอนติดี

- 1.1 ล้างและเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เป็น Rh บวก (D+) และ Rh ลบ (D-) อย่างละ 1 รายในน้ำเกลือปกติ ให้มีความเข้มข้น 1% (v/v)

- 1.2 ทำการเจ็จจางแอนติดีทั้ง 3 ตัวอย่างทดสอบด้วยน้ำเกลือปกติให้มีอัตราการเจ็จจางเป็น 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:600 และ 1:800 ตามลำดับ

- 1.3 นำเซลล์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทดสอบกับแอนติดีปริมาตร 25 ไมโครลิตรที่เจ็จจางในข้อ 1.2 และในหลุมควบคุมการทดสอบใช้น้ำเกลือปกติปริมาตร 25 ไมโครลิตรใส่แทนแอนติดี

- 1.4 เคาะมุมเพลทเบาๆ เพื่อให้เซลล์และแอนติดีรีมผสมให้เข้ากัน

- 1.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25°C) และอ่านผลปฏิกริยาที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาทีด้วยตาเปล่า

การอ่านผล เอียงเพลทให้ทำมุมประมาณ 60 องศา ดูลักษณะการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (agglutination)

ผลลบ = เม็ดเลือดแดงจะค่อยๆ ไหลลงมาเป็นสาย

ผลบวก = เม็ดเลือดแดงจะแผ่อยู่เต็มหลุม หรืออาจติดอกอยู่กับหลุม ไม่ไหลลงมาเป็นสาย แต่อาจ จะหลุดลงมาเป็นก้อนได้

หมายเหตุ หลุมควบคุมเซลล์ทดสอบ จะต้องให้ผลลบจึงจะแปลผลการทดสอบได้

2. การประยุกต์การใส่เซลล์ด้วยวิธีใช้ไม้เขี่ยเซลล์ (stick method)⁽¹¹⁾ แทนการเตรียมเซลล์มาตรฐานความเข้มข้น 1%

ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างทดสอบ 12 ราย เป็น Rh บวก 11 ราย และ Rh ลบ 1 ราย ทดสอบโดยเติมน้ำเกลือปกติจำนวน 25 ไมโครลิตร ลงในเพลทจำนวน 2 หลุมต่อ 1 ราย คือหลุมทดสอบและหลุมควบคุม ใช้ไม้เขี่ยเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มม. และตะลีดให้ติดปลายไม้ใส่ในหลุมทั้งสองให้มีความเข้มข้นประมาณ 1% เลือกแอนติดีที่อัตราการเจือจาง 1:200 เติมน้ำในหลุมทดสอบปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเติมน้ำเกลือปกติปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในหลุมควบคุม เคาะมุมเพลทเบาๆ ให้ส่วนผสม ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25°C) นานประมาณ 30 - 60 นาที อ่านผลโดยการเอียงเพลททำมุมประมาณ 60 องศา คุณลักษณะการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

3. การหาความเสถียร (stability) ของแอนติดีเจือจางในน้ำเกลือปกติ⁽¹⁰⁾

ทำการเจือจางแอนติดีในน้ำเกลือปกติเป็น 1:200 และแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20°C นำแอนติดีที่แช่แข็งนี้มาทดสอบคุณภาพทุก 7 วันเป็นเวลา 6 เดือน โดยทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดง Rh บวกและ Rh ลบ อย่างละ 1 รายด้วยวิธี stick method และทดสอบคุณภาพของแอนติดีหลังจากผ่านการแช่แข็ง นำมาละลายและเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ทำการตรวจสอบคุณภาพทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

4. การตรวจหาแอนติเจนอาร์เอสดีด้วยเทคนิคไมโครเพลทในเลือดผู้บริจาคโลหิต โดยการใช้น้ำเกลือปกติเป็นตัวกลาง

ในการทดสอบแทนการใช้ 1% เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว

ทำการทดสอบหาแอนติเจนอาร์เอสดีบนเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 11,379 ราย ด้วยเทคนิคไมโครเพลทโดยเติมน้ำเกลือปกติปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในเพลทรูปตัววีจำนวน 2 หลุมต่อ 1 ราย คือหลุมทดสอบและหลุมควบคุม ใช้ไม้เขี่ยเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธี stick method ใส่ลงในหลุมทั้งสองให้มีความเข้มข้นประมาณ 1% เติมน้ำแอนติดีที่เจือจางเป็น 1:200 ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบ และเติมน้ำเกลือปกติปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงในหลุมควบคุม เคาะมุมเพลทเบาๆ ให้ส่วนผสม ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-60 นาทีจึงอ่านผล เปรียบเทียบกับการใช้ 1% เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว⁽¹⁰⁾ ใช้แอนติดีเจือจาง 1:200 วิธีการทดสอบเหมือนกัน ทุกครั้ง ในการทดสอบดังกล่าวต้องมีเซลล์ควบคุมที่เป็นแอนติเจนดีบวกและแอนติเจนดีลบอย่างละ 1 ตัวอย่าง

ผลการวิจัย

1. การปรับมาตรฐานการทดสอบโดยวิธีไมโครเพลท

จากการทดสอบเพื่อหาอัตราการเจือจางของแอนติดีทั้ง 3 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบด้วยความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดแดง 1% พบว่า ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 1:400 สามารถตรวจหาแอนติเจนดีบนเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ทุกตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้แอนติเจือจางเป็น 1:200 (ตารางที่ 1)

Table 1 : Titration of Anti-D and concentration of 1% Red cell suspension for antigen-D detection

Dilution of anti-D is NSS	Type of anti-D test with 1% red cell suspension			control NSS
	CSL	DIAGast	Bioclone ortho Diagnostic	
1:50	+	+	+	-
1:100	+	+	+	-
1:200	+	+	+	-
1:300	+	+	+	-
1:400	+	+	±	-
1:600	+	+	-	-
1:800	±	±	-	-

2. ผลการศึกษาการตรวจหาแอนติเจนดีบนเม็ดเลือดแดงโดยวิธี stick method แทนการเตรียมเซลล์มาตรฐานความเข้มข้น 1% ในน้ำเกลือปกติ

จากการตรวจหาแอนติเจนดีบนเม็ดเลือดแดงในตัวอย่างทดสอบ 12 รายซึ่งเป็น Rh บวก 11 รายและ Rh ลบ 1 รายพบว่าให้ผลการทดสอบตรงกันทุกรายและสามารถอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาได้เมื่อตั้งเพลททิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ระยะเวลาตั้งแต่ 30-60 นาที และเมื่อทดลองตั้งเพลทที่อ่านผลแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (ประมาณ 4°C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำมาอ่านผลใหม่ก็ยังไม่ผลชัดเจน

3. การศึกษาความเสถียรของแอนติดีที่เจือจางในน้ำเกลือปกติ⁽¹⁰⁾

พบว่าแอนติดีเจือจาง 1:200 เก็บที่อุณหภูมิ -20°C นำมาละลาย ทดสอบคุณภาพทุก 7 วันเป็นเวลา 6 เดือน สามารถตรวจเซลล์ Rh บวกและ Rh ลบได้ถูกต้อง และทดสอบความเสถียรของแอนติดีเจือจาง 1:200 ที่ผ่านการแช่แข็งนาน 6 เดือน นำมาละลายเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ทดสอบคุณภาพทุกวันเป็นเวลา 14 วัน ให้ผลการทดสอบถูกต้องเช่นเดียวกัน

4. การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติเจนอาร์เอชดีบนเม็ดเลือดแดง โดยใช้น้ำเกลือปกติเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาแทนการใช้ เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกิริยาระดับเดียว

พบว่าเมื่อนำตัวอย่างทดสอบจำนวน 11,379 รายทำการทดสอบกับแอนติดีเจือจาง 1:200 โดยใช้เทคนิคไมโครเพลทวิธี stick method ระหว่างการใช้ น้ำเกลือปกติเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา และการใช้เอนไซม์ปาเปนแบบปฏิกิริยาระดับเดียว พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลตรงกัน คือให้ผลแอนติเจนดีบวกจำนวน 11,352 ราย และให้ผลแอนติเจนดีลบจำนวน 27 ราย (ตารางที่ 2) มีค่าความไว ค่าความจำเพาะและค่าความถูกต้องเท่ากับ 100%

วิจารณ์

การตรวจหาแอนติเจนอาร์เอชดีบนเม็ดเลือดแดงสามารถทดสอบได้หลายวิธี ที่นิยมทั่วไปก็คือวิธีมาตรฐานหลอดทดลองแต่มีข้อเสียคือต้องใช้เวลาใช้จ่ายสูงใช้อุปกรณ์และเวลาในการทดสอบมาก จึงมีผู้ดัดแปลงใช้เทคนิคไมโครเพลทโดยใช้สารละลายชนิดต่างๆ ช่วยเสริมปฏิกิริยาในการหาแอนติเจนดีบนเม็ดเลือดแดง จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์จะมีผลช่วยเสริมการเกิดปฏิกิริยาในหมู่โลหิตระบบอาร์เอชได้ดียิ่งขึ้น⁽¹²⁻¹⁶⁾ ทำให้สามารถใช้แอนติดีเจือจางแทนแอนติดีชนิดเข้มข้นได้ กลไกในการเสริมปฏิกิริยาของเอนไซม์คือจะย่อยผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้แอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงเด่นชัดขึ้น และประจุบนเม็ดเลือดแดงน้อยลง เม็ดเลือดแดงสามารถเข้ามาใกล้กันได้มากขึ้น เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มได้ดีขึ้น แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์ดังกล่าวในห้องปฏิบัติการคลังเลือดทั่วไปอาจจะพบความยุ่งยากและไม่มีความพร้อมในการเตรียม ผู้วิจัยจึงทดลองดัดแปลงใช้น้ำเกลือปกติเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาแทนการใช้เอนไซม์ปาเปน ซึ่งการใช้น้ำเกลือปกติสามารถทำให้ลดแรงผลกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงเข้ามาอยู่ใกล้กัน⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้แอนติดีที่ใช้ในปัจจุบันจะผลิตในรูปของ IgM+IgG ซึ่งจะมีส่วนที่เป็นชนิด Anti D saline reagent (IgM) สามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงที่อยู่บนน้ำเกลือได้ ดังนั้นในการทดสอบตัวอย่างเลือดผู้บริจาคโลหิตจึงให้ผลตรงกันทั้งสองวิธีโดยไม่พบผลบวกหรือผลลบปลอม มีค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) และค่าความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 100%

Table 2 : Result of Rh (D) antigen detected by 1:200 diluted Anti-D in normal saline solution(NSS) in comparison to NSS medium and one stage papain technique

	Diluted anti-D in NSS 1:200	
	D +	D -
Test with NSS	11,352	27
Test with 1% papain	11,352	27

สรุป

การตรวจหาแอนติเจนอาร์เอชดีด้วยเทคนิคไมโครเพลท โดยการเจือจางแอนติดีด้วยน้ำเกลือปกติที่อัตราการเจือจาง 1:200 และใช้น้ำเกลือปกติเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา พบว่ามีค่าความไว ค่าความจำเพาะและค่าความถูกต้องเท่ากับ 100% วิธีทำงานง่ายไม่ยุ่งยากมีความคล่องตัวสูงต่อการทดสอบตัวอย่างจำนวนมากในคราวเดียวกัน ประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในส่วนของการนำยา เหมาะสมสำหรับที่จะนำเทคนิคนี้ใช้ตรวจหาแอนติเจนอาร์เอชดีบนเม็ดเลือดแดงในห้องปฏิบัติการคลังเลือดทั่วไปที่มีปริมาณผู้บริจาคโลหิตจำนวนมาก

เอกสารอ้างอิง

1. โลहितสายธารแห่งชีวิต. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. 2539; 8-9.
2. Bryant, Neville J. An introduction to immunohematology. The RH/Hr Blood System. 1982; 98-115.
3. Sinor LT, Rachel JM, Beck ML, Bayer WL, Coenen WM, Plapp FV. Solid-phase ABO grouping and Rh typing. Transfusion. 1985; 25: 21-3.
4. Leong SW, Terasaki PI. Microtest for red cell typing. Transfusion. 1985; 25: 149-51.
5. Epley KM, Severns ML, Kline LM. A one-step DU test in microplate. Transfusion. 1988; 28: 233-6.
6. Tatsumi N, Tsuda I, Inoue K. Trial of ABO and Rh blood typing with an automated blood cell counter. Clin-Lab-Haematol. 1989; 11: 123-30.
7. Chung A, Birch P, Ilagan K. A microplate System for ABO and Rh(D) blood grouping. Transfusion. 1933; 33(5): 384-8.
8. Richard H. Walker. Technical Manual. 11th Edition. Microplate Techniques Applied to Routine Blood Bank Procedures. 1993; 612-9.
9. ชาญวิทย์ สีสายวัฒน์, มาลินี มีแสง, พรทิพย์ เหลื่อมหมื่นไวย, วาสนา วรรณโอทอง, อมรรัตน์ วานิชขจร, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. การตรวจหาแอนติเจนดีบนเม็ดเลือดแดงโดยวิธีไมโครเพลทประยุกต์. การประชุมวิชาการสมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย. 2532.
10. อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ, ชาญวิทย์ สีสายวัฒน์, มาลินี มีแสง. การดัดแปลงเทคนิคไมโครเพลทเพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนดี. วารสารเทคนิคการแพทย์. 2535.
11. สหวัฒน์ บรรคิวัรักษ์. บรรณาธิการ. เทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลังเลือด. คู่มือปฏิบัติการคลังเลือด. ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2535;4.
12. Leikola J, Perkins HA. Red cell antibodies and low ionic strength: a study with enzyme- Linked antiglobulin test. Transfusion. 1980; 20: 224-8.
13. Gibble JW, Salamon JL, Ness PM. Comparison of antibody elution techniques by enzyme-linked antiglobulin test. Transfusion. 1983; 23: 300-4.
14. Yokoi T, Iwasa M, Sagisaka K. Isolation and purification of Rho(D) antigen of Human erythrocyte membrane and its serological property. Tohoku-J-Exp-Med. 1983; 141: 143-54.
15. Pinkerton PH, Zuber ED, Barr RM, Croucher BE, Quantz MC, Rapson DA, et al. Sensitivity of routine blood bank methods for the detection of anti-D as determined during proficiency testing. AM-J-Clin-Pathol. 1984; 82: 326-9.
16. Ruiz M, Carbonell F, Platas C, Padilla AM. An enzyme linked antiglobulin test for assessing anti-D immunoglobulin preparations. Biologicals. 1990; 18: 89-95.
17. Richard H. Walker. Technical Manual. 10th Edition. Antigens, Antibodies, Complement and the Immune Response. 1990; 140.

