

Silvana Biagini<sup>1,2,3</sup>, Paulo Aguirre Costa<sup>4</sup>, Silvano Wendel<sup>1,2</sup>, Guilherme Schettino<sup>1,3</sup>, Luciano Cesar Pontes Azevedo<sup>1,5</sup>

## Validação *in vitro* e *in vivo* da viabilidade de eritrócitos suínos estocados para estabelecer um modelo experimental de transfusão homóloga de hemácias: estudo piloto

*In vitro and in vivo validation of stored swine erythrocyte viability to establish an experimental model of homologous red blood cell transfusion: a pilot study*

### RESUMO

**Objetivo:** Para desenvolver modelos experimentais de transfusão de hemácias, o primeiro passo é assegurar a viabilidade dos eritrócitos transfundidos. Avaliamos a viabilidade de eritrócitos transfundidos com validação *in vitro* e *in vivo* de eritrócitos suínos homólogos armazenados por 14 dias.

**Métodos:** Neste estudo piloto, o sangue coletado de um suíno Agroceres<sup>®</sup> foi estocado em duas unidades de hemácias. A validação *in vivo* foi realizada pela marcação dos eritrócitos com Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> e recuperação dos eritrócitos viáveis após 24 horas da infusão em um animal autólogo e quatro homólogos. A validação *in vitro* foi realizada na avaliação basal e após 14 dias, pela mensuração da hemoglobina, hematócrito, índice de hemólise e hemoglobina livre em seis unidades de hemácias. Foi realizada uma esplenectomia *post-mortem* para avaliar o sequestro esplênico de eritrócitos, e a radioatividade das amostras de sobrenadante foi contada para avaliar a hemólise intravascular.

**Resultados:** Após 14 dias de estocagem, as unidades de hemácias tinham volumes menores e concentração total de hemoglobina equivalente em comparação aos padrões humanos. A concentração de hemoglobina livre aumentou de 31,0±9,3 para 112,4±31,4mg/dL (p<0,001) e o índice de hemólise aumentou de 0,1±0,1 para 0,5±0,1% (p<0,001). Entretanto, esses testes se encontravam dentro da faixa aceitável para os padrões humanos. A percentagem de radioatividade nas amostras de sobrenadante foi similar na avaliação basal e após 24 horas, afastando, assim, a presença de hemólise significativa. Não se encontraram evidências de sequestro esplênico de eritrócitos radioativos.

**Conclusão:** Hemácias suínas estocadas por 14 dias são viáveis e podem ser utilizadas em estudos experimentais de transfusão. Esses experimentos de validação são importantes para ajudar os investigadores a estabelecerem modelos experimentais de transfusão.

**Descritores:** Medicina transfusional; Eritrócitos; *In vitro*; Suínos; Estudos de validação

1. Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Sírio-Libanês - São Paulo (SP), Brasil.
2. Banco de Sangue, Hospital Sírio-Libanês - São Paulo (SP), Brasil.
3. Programa de Pós-Graduação, Departamento de Cardiopneumologia, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.
4. Departamento de Medicina Nuclear, Hospital Sírio-Libanês - São Paulo (SP), Brasil.
5. Departamento de Emergências Clínicas, Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

**Conflitos de interesse:** Nenhum.

Submetido em 22 de março de 2014

Aceito em 4 de junho de 2014

### Autor correspondente:

Luciano Cesar Pontes Azevedo  
Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês  
Rua Cel. Nicolau dos Santos, 69  
CEP: 01308-060 - São Paulo (SP), Brasil  
E-mail: luciano.azevedo@hsl.org.br

**Editor responsável:** Felipe Dal Pizzol

DOI: 10.5935/0103-507X.20140040

### INTRODUÇÃO

A transfusão de hemácias é um tratamento estabelecido para inúmeras condições de risco à vida. No entanto, surgiram preocupações com relação à associação da transfusão com efeitos danosos e aumento da mortalidade,<sup>(1-4)</sup> embora a literatura a respeito desse tópico seja discordante.<sup>(5,6)</sup> Os mecanismos e efeitos clínicos da transfusão são principalmente descritos em estudos observacionais, que têm, em sua natureza, um potencial inevitável de vieses e fatores residuais de confusão, incluindo a gravidade da doença, a presença de comorbidades frequentes como sepse e trauma, o número de unidades transfundidas e o tempo de armazenagem. Apesar do uso de técnicas estatísticas que podem ajustar os fatores de confusão, é

muito difícil estabelecer o papel independente da transfusão nos desfechos adversos nessas condições.<sup>(7)</sup>

Modelos experimentais vêm sendo cada vez mais utilizados para avaliar os mecanismos dos efeitos de intervenções comumente usadas em terapia intensiva.<sup>(8)</sup> Assim, o modelo suíno pode ser uma importante ferramenta para estudar os efeitos hemodinâmicos e respiratórios das transfusões em cenários de pacientes gravemente enfermos, já que esses animais têm similaridades fisiológicas com os seres humanos em relação a esses dois importantes sistemas.<sup>(7)</sup> Desse modo, um modelo controlado de transfusão de hemácias em suínos saudáveis pode ser uma abordagem interessante para conduzir estudos dos mecanismos e avaliar os efeitos isolados da transfusão de hemácias, sem as variáveis com potenciais efeitos de confusão presentes nos estudos clínicos.

Para desenvolver adequadamente um modelo experimental de transfusão, o primeiro passo é assegurar que os eritrócitos transfundidos sejam viáveis. Assim desenvolvemos este estudo piloto para avaliar a viabilidade das hemácias transfundidas, com validação *in vitro* e *in vivo* de eritrócitos suínos homólogos armazenados por 14 dias, utilizando o procedimento padrão para seres humanos.

## MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês, em São Paulo (SP), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisas com Animais da instituição. O estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes do *National Institute of Health* para o uso de animais de experimentação.

### Validação *in vivo* do sangue

Para avaliar a viabilidade da coleta e armazenagem de eritrócitos suínos nas condições usuais em um banco de sangue, e validar *in vivo* a sobrevivência dos eritrócitos, realizamos uma experimentação piloto, na qual um porco Agrocercos<sup>®</sup> (50kg) foi mantido sob anestesia com halotano (0,5%), teve a inserção de um cateter venoso central em condições assépticas e foi submetido a uma hemorragia controlada de 1.030mL (30% do volume sanguíneo total). O sangue total foi coletado em bolsas duplas com citrato, fosfato, dextrose e adenina-1 e sem filtros de leucorredução (Fresenius Hemo Care, São Paulo, SP). Após a infusão de 3.000mL de solução salina normal para repor as perdas sanguíneas, a anestesia foi encerrada e o animal foi encaminhado para sobrevida. As unidades contendo sangue total foram centrifugadas a 3.300rpm, por 16 minutos (centrífuga Beckman-Spinchron 15, Beckman Coulter, Califórnia, Estados Unidos), o plasma foi descartado e as duas unidades de hemácias obtidas foram mantidas sob temperatura controlada (2° a 6° C) por 14 dias. A temperatura alvo foi monitorada por meio de um gravador

de temperatura (Ibbutton DS1921g, Maxim-Dallas, Califórnia, Estados Unidos).

A validação da sobrevivência dos eritrócitos e a avaliação da hemólise *in vivo* foram realizadas por meio de marcação dos eritrócitos com Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> radioativo e recuperação dos eritrócitos viáveis 24 horas após a transfusão, segundo uma adaptação de estudos prévios.<sup>(9,10)</sup> Para esses ensaios, cinco porcos machos Agrocercos<sup>®</sup> (incluindo o que foi submetido à hemorragia 14 dias antes) foram mantidos sob anestesia com halotano (0,5%) e paralização muscular com uso de pancurônio (infusão intermitente de 0,1mg/kg). Então, 0,7mL de cromato de sódio radioativo (lote 803 C 20002 IPEN/CNEN/SP, calibrado em 23 de janeiro de 2008 e com período de validade até 11 de abril de 2008, atividade de 185MBq) foi acrescentado a 100g de eritrócitos de uma das bolsas de hemácias armazenadas. Esse procedimento foi realizado com adição de ácido ascórbico (200mg). Foi injetado nos animais o equivalente a 2,5mL/kg (0,412MBq/kg ou 0,01mCi/kg), a partir da amostra marcada com cromato de sódio - 16mL nos quatro animais homólogos (pesos entre 37 e 38kg) e 24mL no animal autólogo (peso de 60kg). As mensurações foram feitas com dez microlitros de sangue total coletados em diferentes intervalos de tempo (5 e 10 minutos, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas), segundo um método modificado de "média de valores precoces".<sup>(10)</sup> Uma média das contagens iniciais (5 e 10 minutos) foi realizada para obter um valor basal de 100% (tempo zero). As amostras foram submetidas a contagem em um contador de radiação gama automático (Wizard 3 Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos). Os coeficientes de variação foram de 0,3%.

A análise da sobrevivência de eritrócitos após 24 horas foi feita com base na percentagem de eritrócitos marcados com material radioativo sobreviventes até 24 horas,<sup>(8)</sup> determinado como se segue:

$$\text{Sobrevivência de eritrócitos após 24 horas (\%)} = \frac{\text{Média simples cpm/mL RBC (tempo = 24 horas} \times 100)}{\text{cpm/mL RBC (tempo = zero hora)}}$$

onde RBC indica eritrócitos; cpm indica contagem por minuto da radioatividade nas amostras durante períodos pré-fixados corrigida pelas concentrações de hemoglobina e hematócrito, e o tempo zero é a média entre as medidas após 5 e 10 minutos (tempo para homogeneização do cromato no espaço intravascular).

Além disso, o controle da radioatividade livre no sobrenadante de todas as amostras coletadas foi realizado utilizando a mesma metodologia descrita.

Um animal morreu na sexta hora do ensaio (provavelmente devido a hipóxia), tendo sido realizada uma esplenectomia imediatamente após o óbito. Dentre os quatro animais

remanescentes, a esplenectomia foi realizada após 24 horas do início do estudo, imediatamente após o sacrifício do animal com uma dose elevada de cloreto de potássio. Os baços foram examinados para identificação de sequestração esplênica de eritrócitos por meio de cintilografia utilizando uma câmera gama (Siemens Orbiter, Hoffman Estates, Illinois, Estados Unidos) com colimação de energia de 360keV, fototipo centrado em 320keV e uma janela de 20% com processamento digital de imagem.

### Validação *in vitro* do sangue

A validação *in vitro* do concentrado de hemácias foi realizada nos ensaios a seguir em 16 unidades de hemácias coletadas e armazenadas, conforme descrito anteriormente. As mensurações foram realizadas no dia da coleta (basal) e no 14º dia de armazenagem, por meio da avaliação das unidades quanto a volume, concentração de hemoglobina e hematócrito, concentração de hemoglobina livre e determinação do índice de hemólise, por meio do método de peroxidase, conforme previamente descrito.<sup>(10)</sup> A contaminação bacteriana das unidades foi avaliada pela coleta de 8mL das primeiras duas unidades de hemácias para cultura de sangue (BacT Alert, BioMérieux, Durham, NC, Estados Unidos).

### Análise estatística

Utilizando o modelo de adequação de Kolmogorov-Smirnov, os dados foram considerados normais e foram apresentados como médias e desvio padrão. Os dados foram comparados utilizando-se o teste *t* pareado e ANOVA para medidas repetidas, conforme indicado, sendo o valor de  $p \leq 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Foi utilizado o pacote estatístico comercialmente disponível SigmaStat 2.0 (Systat Software, California, Estados Unidos).

## RESULTADOS

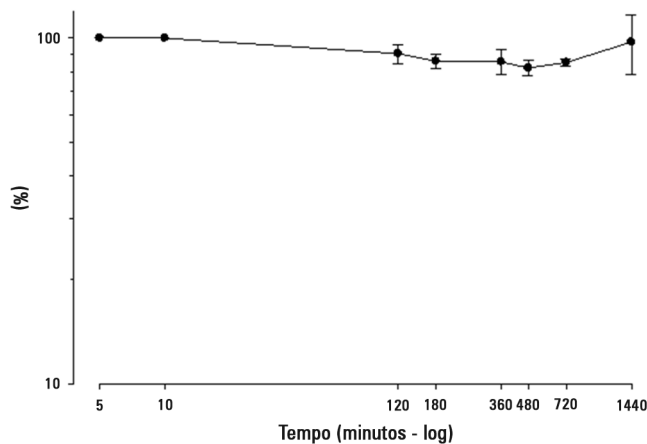
Apresentamos, na tabela 1, as características principais das unidades de hemácias e os resultados dos ensaios de validação *in vitro*. A validação *in vitro* foi realizada por meio da mensuração dos diferentes parâmetros no dia da coleta (basal) e no 14º dia de armazenagem. Conforme esperado, ocorreu um aumento significativo da hemoglobina livre após a armazenagem, assim como do índice de hemólise. Não foram encontradas outras diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros medidos.

**Tabela 1** - Validação *in vitro* de unidades de hemácias

Período	Volume (mL)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Hemoglobina total (g)	Hemoglobina livre (mg/dL)	Índice de hemólise (%)
Basal	249,3 ± 44,0	73,3 ± 3,5	23,3 ± 1,4	55,8 ± 6,6	31,0 ± 9,3	0,1 ± 0,1
14º dia de armazenagem	235,1 ± 22,5	71,1 ± 2,3	22,2 ± 1,5	52,2 ± 6,2	112,4 ± 31,4*	0,5 ± 0,1*

\*  $p < 0,001$  em comparação ao basal (teste *t* pareado).

A figura 1 apresenta os resultados dos ensaios de validação *in vivo*, que incluíram a marcação de eritrócitos com cromato e a mensuração da porcentagem de células que permaneceram viáveis até 24 horas após a infusão. Não ocorreram alterações significantes no número de células viáveis durante o tempo do estudo e, após 24 horas, uma porcentagem média de 97,5% das células marcadas continuava viável.



**Figura 1** - Viabilidade *in vivo* de hemácias marcadas com cromato de sódio radioativo até 24 horas.

A porcentagem de radioatividade livre nas amostras de sobrenadante após 5, 10, 120, 180, 360, 720 e 1.440 minutos foram respectivamente de 1,1 ± 0,1%, 1,1 ± 0,2%, 0,9 ± 0,2%, 0,9 ± 0,2%, 0,7 ± 0,1%, 1,3 ± 1,1% e 0,8 ± 0,3% (diferenças não significantes, análise de variâncias - ANOVA para medidas repetidas). Esses resultados afastaram a ocorrência significativa de hemólise intravascular. Além disso, a cintilografia esplênica não encontrou qualquer sinal de radioatividade no baço, afastando, desse modo, o sequestro esplênico de eritrócitos. Finalmente, os resultados da cultura de sangue nas unidades analisadas foram negativos.

## DISCUSSÃO

O modelo suíno foi usado de forma consistente para estudos experimentais de transplantes de órgãos e tecidos, assim como para investigações ligadas a terapia intensiva, em razão de sua similaridade aos seres humanos com relação à anatomia e fisiologia. Contudo, há poucos estudos experimentais sobre a mecânica das transfusões de hemácias, principalmente

em razão das dificuldades no estabelecimento de modelos em animais que imitem as condições em seres humanos.<sup>(7)</sup> Temos o objetivo de desenvolver um modelo de transfusão de hemácias nas condições da terapia intensiva. Assim, nossa intenção com os experimentos aqui descritos foi investigar se hemácias suínas estocadas por 14 dias sob condições padrão em bancos de sangue manteriam sua viabilidade e, assim, poderiam ser utilizadas em experimentos futuros de transfusão relacionada a doenças graves. Demonstramos que essas células permaneceram viáveis *in vivo* por até 24 horas após a administração e a validação *in vitro* demonstrou ausência de hemólise significativa após 14 dias de armazenagem. Considerados em conjunto, nossos resultados reforçam a possibilidade de desenvolver modelos experimentais em suínos para estudar os efeitos agudos da transfusão nas condições de cuidados graves, removendo diversos dos vieses associados aos estudos de transfusão em condições da prática clínica.

A validação *in vitro* observou um volume menor das unidades em comparação aos seres humanos, mas com equivalência, em termos de concentração total de hemoglobina e hematócrito. Esses resultados concordam com os de outros estudos<sup>(7,11,12)</sup> e são, provavelmente, devidos a concentrações mais baixas de hemoglobina nos animais, em comparação aos seres humanos.<sup>(7,12-14)</sup> Nossos resultados mostraram também um aumento significativo da concentração de hemoglobina livre e do índice de hemólise após a armazenagem. Entretanto, todos os parâmetros investigados se encontravam dentro de faixas aceitáveis, utilizando como padrão os dados de hemácias armazenadas de seres humanos,<sup>(15,16)</sup> e concordaram com dois estudos prévios do mesmo grupo, que demonstraram alterações similares após armazenagem de hemácias suínas por 35 dias sob condições utilizadas para seres humanos.<sup>(7,12)</sup> Infelizmente, diferentemente do nosso, esse estudo não relatou validação *in vivo* de suas unidades.

Os métodos utilizados para avaliar a viabilidade das hemácias *in vitro* são comumente incapazes de prever se a amostra sobreviverá após a transfusão. Assim, para avaliar *in vivo* a viabilidade das hemácias armazenadas, marcamos as mesmas com um isótopo radioativo e observamos a percentagem que permaneceu viável 24 horas após a infusão em cinco animais. Demonstramos uma percentagem média de 97,5% das células marcadas ainda viáveis após 24 horas. Esses dados demonstram a adequada sobrevivência das hemácias nesse

período, já que o padrão-ouro da viabilidade de hemácias é a sobrevivência após 24 horas de 75% das células marcadas injetadas.<sup>(17-19)</sup> Outros resultados que reforçam a ausência de hemólise significativa são as baixas contagens de radioatividade nas amostras de sobrenadante e a ausência de radioatividade nos baços dos animais, sugerindo, assim, que a vasta maioria dos eritrócitos circulava em sua forma intacta 24 horas após a transfusão.

Os pontos fortes deste estudo incluíram a associação de métodos para medir a viabilidade *in vitro* e *in vivo* da transfusão, o que não foi relatado em estudos prévios, e acrescenta credibilidade aos nossos achados. Por outro lado, as principais limitações foram o pequeno número de animais analisados, o que poderia causar erros tipo II, e a falta de mensuração de marcadores *in vitro* mais específicos para a viabilidade, comumente relacionados a lesão por armazenagem, como adenosina trifosfato, 2,3-difosfoglicerato e lactato. Além disso, não analisamos os efeitos da transfusão em modelos de animais durante condições clínicas que são mais relevantes em unidades de cuidados críticos, como sepse e choque hemorrágico. Assim, a importância clínica dos achados deste estudo é incerta. Como este é um estudo piloto para assegurar que as hemácias transfundidas sejam viáveis, estamos agora realizando ensaios para investigar a mecânica dos efeitos da transfusão em ambientes relacionados aos cuidados críticos.

## CONCLUSÃO

Este estudo piloto demonstrou que hemácias suínas armazenadas por 14 dias sob condições utilizadas para seres humanos conservaram sua viabilidade, conforme avaliado por ensaios *in vitro*, utilizando hemoglobina livre e índice de hemólise, e *in vivo*, utilizando marcação com cromato. Nossos resultados abrem possibilidades de realizar estudos experimentais sobre a mecânica dos efeitos da transfusão de hemácias armazenadas em condições controladas de doenças graves, como trauma ou sepse.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo teve apoio do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês e do Banco de Sangue do Hospital Sírio-Libanês, ambos localizados em São Paulo.

## ABSTRACT

**Objective:** To develop experimental models of erythrocyte transfusion, the first step is to ensure the viability of the red blood cells transfused. In this pilot study, we assessed the viability of transfused red blood cells with validation *in vitro* and *in vivo* of homologous swine erythrocytes stored for 14 days.

**Methods:** Blood collected from one Agrocetes<sup>®</sup> swine was stored in two red blood cell units. *In vivo* validation was performed by labeling the red blood cells with  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  and recovering the viable erythrocytes after 24 hours of infusion in one autologous and four homologous animals. *In vitro* validation was performed at baseline and after 14 days in sixteen red blood cell units by measuring hemoglobin, hematocrit, hemolysis

index and free hemoglobin. A post-mortem splenectomy was performed to evaluate the splenic sequestration of erythrocytes, and the radioactivity of the supernatant samples was counted to evaluate intravascular hemolysis.

**Results:** After 14 days of storage, the red blood cell units had lower volumes and equivalent total concentrations of hemoglobin and hematocrit compared to human standards. The free hemoglobin concentration increased from  $31.0 \pm 9.3$  to  $112.4 \pm 31.4$  mg/dL ( $p < 0.001$ ), and the hemolysis index increased from  $0.1 \pm 0.1$  to  $0.5 \pm 0.1$  % ( $p < 0.001$ ). However, these tests were within the acceptable range for human standards.

The percentage of radioactivity in supernatant samples was similar at baseline and after 24 hours, thus excluding significant hemolysis. No evidence of splenic sequestration of radioactive erythrocytes was found.

**Conclusion:** Swine red blood cells stored for 14 days are viable and can be used in experimental studies of transfusion. These validation experiments are important to aid investigators in establishing experimental models of transfusion.

**Keywords:** Transfusion medicine; Erythrocytes; In vitro; Swine; Validation studies

## REFERÊNCIAS

- Hajjar LA, Auler Junior JO, Santos L, Galas F. Blood transfusion in critically ill patients: state of the art. *Clinics (São Paulo)*. 2007;62(4):507-24.
- Rosa SD, Bristot ML, Topanotti MF, Tomasi CD, Felisberto F, Vuolo FS, et al. Efeito da transfusão de concentrado de hemácias sobre parâmetros de inflamação e estresse oxidativo em pacientes criticamente enfermos. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(1):30-5.
- Vincent JL, Baron JF, Reinhart K, Gattinoni L, Thijs L, Webb A, Meier-Hellmann A, Nollet G, Peres-Bota D; ABC (Anemia and Blood Transfusion in Critical Care) Investigators. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA*. 2002;288(12):1499-507.
- Weiskopf RB, Feiner J, Toy P, Twiford J, Shimabukuro D, Lieberman J, et al. Fresh and stored red blood cell transfusion equivalently induce subclinical pulmonary gas exchange deficit in normal humans. *Anesth Analg*. 2012;114(3):511-9.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung C, Harboe S, Damas P; Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Investigators. Are blood transfusions associated with greater mortality rates? Results of the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients study. *Anesthesiology*. 2008;108(1):31-9.
- Parsons EC, Hough CL, Seymour CW, Cooke CR, Rubenfeld GD, Watkins TR; NHLBI ARDS Network. Red blood cell transfusion and outcomes in patients with acute lung injury, sepsis and shock. *Crit Care*. 2011;15(5):R221.
- Patel NN, Lin H, Toth T, Welsh GI, Jones C, Ray P, et al. Reversal of anemia with allogenic RBC transfusion prevents post-cardiopulmonary bypass acute kidney injury in swine. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(3):F605-14.
- Azevedo LC, Park M, Noritomi DT, Maciel AT, Brunialti MK, Salomão R. Characterization of an animal model of severe sepsis associated with respiratory dysfunction. *Clinics (São Paulo)*. 2007;62(4):491-8.
- Moroff G, Sohmer PR, Button LN. Proposed standardization of methods for determining the 24-hour survival of stored red cells. *Transfusion*. 1984;24(2):109-14.
- Marcus CS, Myhre AB, Angulo MC, Salk RD, Essex CE, Demianew SH. Radiolabeled red cell viability. I. Comparison of  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , and  $^{111}\text{In}$  for measuring the viability of autologous stored red cells. *Transfusion*. 1987;27(5):415-9.
- Dacie JV, Lewis SM, editors. *Practical haematology*. New York: Churchill Livingstone; 1984.
- Patel NN, Lin H, Jones C, Walkden G, Ray P, Sleeman PA, et al. Interactions of cardiopulmonary bypass and erythrocyte transfusion in the pathogenesis of pulmonary dysfunction in swine. *Anesthesiology*. 2013;119(2):365-78.
- Friendship RM, Lumsden JH, McMillan I, Wilson MR. Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. *Can J Comp Med*. 1984;48(4):390-3.
- Hanno JP, Bossone CA, Wade CE. Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci*. 1990;40(3):293-8.
- Council of Europe. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*. Strasbourg, France: Council of Europe Publishing; 2006.
- Brecher ME, American Association of Blood Banks. *Technical manual*. 15<sup>th</sup> ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2005.
- Klein HG, Spahn DR, Carson JL. Red blood cell transfusion in clinical practice. *Lancet*. 2007;370(9585):415-26. Review.
- Mollison PL. Further observations on the normal survival curve of  $^{51}\text{Cr}$ -labelled red cells. *Clin Sci*. 1961;21:21-36.
- Dummont LJ, AuBuchon JP. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion*. 2008;48(6):1053-60.