

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่



BULLETIN OF
CHIANG MAI
MEDICAL TECHNOLOGY

VOLUME 4

SEPTEMBER 1971

NUMBER 3

บริษัท อุตสาหกรรม จำกัด

๕๑ อาคาร ๘ ถนนราชดำเนิน พระนคร
ต.ป.ณ. ๒-๕๑ โทรศัพท์ ๘๑๖๔๑๕, ๘๑๖๒๒๔

บริการและจำหน่าย

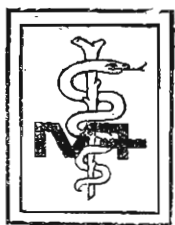
เคมีภัณฑ์, อุปกรณ์วิทยาศาสตร์
เทคนิคทางวิทยาศาสตร์โดยทั่วไป
เพื่อการศึกษา, วิเคราะห์, วิจัย และอุตสาหกรรม
ทุกสิ่งทุกอย่างเกี่ยวกับวิทยาศาสตร์การแพทย์
โปรดติดต่อกับ

บริษัท อุตสาหกรรม จำกัด

เป็นผู้แทนจำหน่ายแต่ผู้เดียวในประเทศไทย ของบริษัทต่อไปนี้

1. **Griffin & George. England**
British leading Supplier & Manufacturer of Scientific equipments for Chemistry-Physics-Biology and Applied Sciences
2. **Stanton Instrument Ltd. England**
Manufacturer of Analytical Balance, Equipments for Thermogravimetry-Differential Thermal Analysis
3. **LBK-Produkter AB. Sweden**
Advanced Research Equipments with Special Emphasis in Bio-Medicine & Bio-Chemistry
4. **PHYWE AG. German**
German Leading Manufacturer & Supplier for Scientific equipments in the field of Physic Chemistry Biology and Applied Research Techniques.
5. **W. Buchi Glasapparate Fabrik. Switzerland**
Swiss Manufacturer of Scientific Glass Apparatus for Advanced Research and Routine Control Laboratories
6. **Orion Research Inc. U.S.A.**
Manufacturer of Specific Ion Meters & Specific Ion Electrodes-A Whole New Technology for Chemical Measurement.
7. **Van Water & Rogers Inc. U.S.A.**
US & World Leading Scientific Supplier and Manufacturer for Scientific Instruments and Apparatus for industrial, educational, Clinical & Research Laboratories.

e t c.



วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Volume 4

September 1971

Number 3

CONTENTS

Editorial	Patraporn Chomcherngpat B.Sc. (Med. Tech.) C (ASCP)	111
Study on Metacercaria of Opisthorchis spp. in Chiang Mai Province	Anun Sujjanuh B.Sc. (Med. Tech.) Prayuth Thitasut M.D.	113
A Simple Method for Determination of Serum Methotrexate	Chairat Asavapaka B.Sc. (Med. Tech.) Malinee Chaovapan B.Sc. (Med. Tech.) Panja Kulapongs M.D.	125
Excretion Patterns of Steroids in Urine of Normal Adult Thai Males and Patients Undergoing Treatment at the Nakorn Chiang Mai Hospital	Audomsark Haesungcharern B.Sc. Hons. (Med. Tech.) Muni Keoplung M.D.	133
Air Sampling for Microorganisms in Operating rooms and Surgical Wards, Nakorn Chiang Mai Hospital	Panya Polpruksa B.Sc. (Med. Tech.) Netr Suwankrughasn B.Sc. (Med. Tech.) Prayool Inboriboon B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc. Kampol Panas-ampol M.D.	145
Comparison of Media for Growth of the Fastidious Organisms	Pensri Vannareumol B.Sc. (Med. Tech.) Kampol Panas-ampol M.D.	153
Abstracts		165
News		170

สำนักงาน : โรงเรียนเทคนิคการแพทย์
คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Office : School of Medical Technology
The Faculty of Medicine
Chiang Mai University.

กำหนดออก : ราย 4 เดือน (มกราคม,
พฤษภาคม, กันยายน)

Published : Tertially (January, May,
September)

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

บรรณาธิการ

อาจารย์ชั้นพิเศษ นายแพทย์ชัยโรจน์ แสงอุดม, พ.บ.

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

เนตร สุวรรณคุณาสัน วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), Cert. in Imm.

กองบรรณาธิการ

สนอง ไชยารักษ์	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
สวัสดิ์ ลังกาสี	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
ไพโรจน์ สภาวิจิตร	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
ประยูร อินบริบูรณ์	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม.
ผาสุก ชมเชิงแพทย์	M.T. (ASCP.)
สุชาติ ศิริกุล	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
ประสิทธิ์ เพชรอนันต์	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

แพทย์ผู้

แพทย์ศรี วรรณกุล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ที่ปรึกษาวิชาการ

ศาสตราจารย์	นายแพทย์ตะวัน กังวานพงศ์	พ.บ., D.T.M. & H. (Liverpool)
รองศาสตราจารย์	นายแพทย์กัมพล พันคำพล	พ.บ.
ศาสตราจารย์	นายแพทย์ประยุทธ์ ภูติสุข	พ.บ., M.Sc.
ผู้ช่วยศาสตราจารย์	นายแพทย์มนี แก้วปลั่ง	พ.บ.
ผู้ช่วยศาสตราจารย์	นายแพทย์มนตรี กันตะบุตร	พ.บ., Cert. in Physio, Biochem, and Neuro-Anatomy.
ผู้ช่วยศาสตราจารย์	นายแพทย์สนาน สิมารักษ์	พ.บ., C. R. (Yale), Dip. Am. Board of Radiology.
ศาสตราจารย์	นายแพทย์บริบูรณ์ พรพิบลย์	พ.บ., M.S.
	นายแพทย์บุญจะ กลพงษ์	พ.บ., Dip. Am. Board of Pediatrics.



Editorial

Medical Technology in the U.S.A.

The course in medical technology was established to prepare men and women for professional work in clinical laboratory procedures and for advanced study in the basic sciences and in medical technology.

A medical technologist is trained in the performance of various diagnostic procedures. The work includes:

Hematology
Urinalysis
Bacteriology
Serology
Electrocardiology
Basal metabolism
Parasitology
Blood grouping
Histology

and the clinical chemistry.

This work requires intelligence, accuracy, and reliability of a high order.

It is recommended that the prospective students take physics, mathematics, chemistry and biology in high school.

Freshmen and Sophomore year:

The following courses or their equivalents must be completed before admission to the junior year:

Orientation in medical technology
Mathematics
Principles of Chemistry
Organic Chemistry
Quantitative analysis

Biology

Physics

Microbiology

Anatomy

Communication

Electives to make a total of 90 credits for 2 years.

Junior year:

The following courses must be completed before assignment to the senior year of hospital training can be made:

Biochemistry (include Physiology)
Human physiology
Introduction to clinical hematology
Clinical chemistry
Introduction to clinical chemistry
Hematology
Parasitology
Medical Microbiology
Immunology
Urinalysis
Blood grouping & Serology

Senior year:

include the following courses in medical technology:

Basic Electronics in Laboratory Instruments
Clinical Chemistry
Advanced Clinical Practice
Clinical Hematology
Clinical Microbiology

Special Clinical Microbiology
Clinical Immunology
Histo - Techniques
EKG, Basal Metabolism Testing

Degree :

Requirements for graduation :

completion of all the required courses or their equivalents,
completion of the practical work,
and a total of 180 quarter credits and 360 grade points- an average of 2 grade points per credit.

THE REGISTRY OF MEDICAL TECHNOLOGISTS OF THE AMERICAN SOCIETY OF THE CLINICAL PATHOLOGISTS.

Requirements for MT (ASCP)

1. Completion of the first 3 years of college in medical Technology with the approval of the ASCP.
2. one year of hospital training from one of the accredited school of the Registry of Medical Technologists.

After completion of the one year training the students can send the application for admittance to the Registry examination which has been approved by the Board of Registry. The students who pass the examination will be certified as MT (ASCP). In order to get their transcripts of the first 3 years of college approved. They should be sent to:

Harold K. Joyce
Registrar
Registry of Medical Technologists
The American Society of the Clinical Pathologists
P.O. Box 729
Chicago, Illinois
U. S. A.

The one year training from the accredited school includes the following courses :

Urinalysis
Clinical Microbiology
Clinical Chemistry
Hematology
Parasitology
Serology
Histology
Blood Banking

Requirement for the Certificate in Chemistry
Pre-technical training requirements

Bachelor's degree from any college or university accredited by a recognized standardizing association, with a major in chemistry, or the equivalent to a major, including inorganic, qualitative, quantitative, and organic chemistry.

Technical training requirements

One year of experience in chemistry in an acceptable medical laboratory. The examination covers the chemistry of any part of the body, or body fluids, as well as instrumentation, chemical mathematics, and nomenclature.

The students who pass the examination will be certified as C (ASCP)

Requirements for the Certificate in Microbiology

Pre-technical training requirements

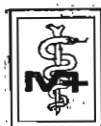
Bachelor's degree from any college or university accredited by a recognized standardizing association, with a major in bacteriology or the equivalent to a major.

Technical training requirements

One year of experience in microbiology in an acceptable medical laboratory. The examination includes bacteriology, serology, immunology, parasitology, and mycology.

Ref : University of Minnesota Bulletin (1967-69), Division of Medical Technology.

Patraporn Chomcherngpat
B.Sc. (Med. Tech.)
C (ASCP)



Studies on Metacercaria
of
Opisthorchis spp. in Chiang Mai, Thailand

Anun Sujjanun, B.Sc. (Med. Tech) *

Prayuth Thitasut, M.D. **

Abstract

Five hundreds and twelve of fresh water fishes of **Puntius leiakanthus**, **Puntius orphoides** and **Esomus metallicus** species in Cyprinoid family collected in Chiang Mai areas were examined and the metacercarial forms of **Opisthorchis** spp. were observed in 259 fishes (51 per cent). The metacercarial cysts were 17 in average in each fish. The highest incidence of metacercariae was in **Puntius orphoides** (94 per cent) and there were 97 cysts in average in each of them. In **Esomus metallicus**, the incidence was 8 per cent and 11 cysts of metacercariae were observed in each. The average sized of the metacercarial cysts was 195×150 microns. The opisthorchis eggs were detected in feces after 35-41 days of infected hamsters and the percentage of infective incidence was 14-46.

Sadun (1955) (1) studied the incidence of **Opisthorchis viverrini** in Thailand and found that there were 19-55 and 4 per cent in the Northeast and the North respectively. He also noted that the incidence was 8 per cent around the Laotian border in the Northern part of Thailand. Vajrasuthira, S. and Harinasuta, C. (1957) (2)

reported that the incidence of liver fluke was 20.5 per cent in Chiang Mai, 19.9 per cent in Nan, 14.8 per cent in Lam-pang and 10.1 per cent in Prae. The people in those mentioned areas like to have the cooking fashion of raw fishes for meals. Studies of cercariae in snails, the first intermediate hosts and metacercariae

* Department of Pathology, Vajira Municipal Hospital, Bangkok, Thailand.

** Professor of Parasitology and Head, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

in fresh water fishes, the second intermediate hosts in the Northeastern part were reported by the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University. (3) Because of no treatment of choice for cases of opisthorchiasis at present, the preventive measures are so much important to handle this disease in Thailand.

Previously mentioned, the percentage of cases of liver fluke observed in Chiang Mai was 20.5 which was considered to be rather high. Brandt (1963) (5) studied snails in various areas in Thailand including Chiang Mai, he found that the cercariae of *Opisthorchis viverrini* were hatched and shed from the snails, *Digoniostoma funiculata* which was the first intermediate host. However, the study on metacercariae in fresh water fishes of Cyprinoid family was not done. Na-Bang Xang et al (1969) (4) reported the incidence of opisthorchiasis cases which were around 27.6 per cent in Amphur Sarapee.

The purpose of this study is to search for metacercariae of *Opisthorchis* spp. in some areas in Chiang Mai Province. The incidence of metacercariae of *Opisthorchis* spp. in fresh water fishes (Cyprinoid) and the morphologic studies of metacercarial cysts and adult liver flukes are also included.

Material and Methods :

The fresh water fishes (Cyprinoid) were collected from various Tambols (district) of Amphur Sarapee and San Kam pang. Most of them were *Puntius leia-*

canthus. The remainings were *Esomus metallicus* and *Puntius orphoides*.

Method of Examination of Fishes :

As we know, the metacercariae may be found in the chest, ventral and dorsal fins; tail, scales and flesh. So all mentioned specimens were separated and cut in small pieces which were transferred on the prepared drops of saline on the glass-slides (7.5×20.0×0.8 cm). Then the specimens were pressed by another glass-slides and examined under the dissecting microscope to look for the metacercarial cysts. It might be worthwhile to note that the flesh must be carefully prepared and free from skin and bones. The observed metacercarial cysts were removed by using the dissecting needles and kept in 0.85 per cent normal saline solution for further detailed morphologic studies of metacercariae and infested in the experimental animals

Procedures for Infestation in the Experimental Animals :

The experimental animals used in this study were white mice (150 gms. average weight) and hamsters (90-100gms. average weight). The stool examinations by formalin-ether concentration technique of all experimental animals were performed for seven consecutive days and they were absolutely considered free from opisthorchiasis. The animals were anaesthetized by ether inhalation method and hang them

by strings tied to their upper teeth. The polyethylene stomach tubes, one millimeter in diameter, were applied and exactly introduced into the stomach. Test for the proper in place of the stomach tube by placing the remaining end of the stomach tube underneath the water was performed. If the air bubbles occurred related to their respiration, the stomach tube was missed into the lungs. The application had to be again tried. Approximately 30-50 prepared metacercarial cysts were injected into the stomach tube. The syringe and stomach tube were rinsed several times with normal saline in order to confirm that all the metacercarial cysts were introduced.

Results :

The fishes examined were in Cyprinoid family and they were *Puntius leiakanthus*, *Esomus metallicus* and *Puntius orphoides*. All 512 fishes were caught from various areas of Amphur Sarapee and San Kampang. The results were as follows :

1. Thirty-seven out of 512 fishes collected from Tambol Chompoo, Amphur Sarapee were found to harbour metacercariae, so the incidence was 24.2 per cent. There were 12 metacercarial cysts in average in each fish.

2. The metacercarial cysts were observed in 61 out of 141 fishes obtained from Tambol Sansai, Amphur Sarapee, so the percentage of incidence was 43.2 and

the average metacercarial cysts per fish was 20.5.

3. There were 195 fishes caught from canals along the Lampang-Chiang Mai Hight way at the kilometer 12. The metacercarial cysts were seen in 147 fishes, so the incidence was 75.3 per cent. The average metacercarial cysts per fish was 17.4.

4. The fishes collected from Tambol San Kowng, Amphur San Kampang were 24 in number. Fourteen of them were positive for metacercariae, so it was 58.3 per cent incidence and the average numbers of metacercarial cysts in each fish were 4.7.

The total numbers and species of fishes obtained from several areas in Amphur Sarapee and San Kampang, numbers of the metacercarial cysts observed and the average numbers of the metacercarial cysts in each were tabulated in Table I. and II.

The average size of living 100 metacercarial cysts was 195×150 microns as shown in Table III.

The duration of the experimental feeding of metacercarial cysts in three white mice and nine hamsters was 30 days. The fecal examinations by simple and concentration methods were performed every day and the opisthorchis ova were negative in white mice but the opisthorchis ova were positive in hamsters after

35-41 days after inoculation. The stool examinations in hamsters were continued for seven days, and the two hamsters were sacrificed. Fourteen and nineteen adult liver flukes were identified in both. The numbers of the metacercarial cysts fed in these two hamsters were 30 and 50 respectively, so the incidence of infestation was 46.6 and 38.0 per cent. Another two hamsters fed with 50 metacercarial cysts were dead with unknown cause after 35 days of experimental feeding. The autopsies were performed carefully. There were 21 and 7 adult liver flukes identified respectively, therefore, the percentage of infective incidence was 42 and 14. The remaining five hamsters were kept feeding for further study. The details about the numbers of metacercariae developed to be adult liver flukes in hamsters, areas and species of fishes that harboured metacercariae, duration of positive stool examination for opisthorchis ova after the experimental feeding were presented in Table IV.

Discussion :

The metacercariae observed in fresh water fishes (Cyprinoid) collected from various areas of Amphur Sarapee and San Kamphang showed the same morphologic characteristics as reported by Vajrasthira, (1961). The morphologic characteristics of the body of metacercariae are folded within the cyst and frequently appears to be C-shaped. The mature larvae move

vigorously at room temperature. When the metacercariae are at rest, the characteristic excretory corpuscles and the brownish-yellow pigment scattered throughout the body are clearly visible. The excretory bladder appears as an oval area composed of masses of dark granules. The oral and ventral suckers are usually also clearly seen (Picture I). The total numbers of metacercarial cysts were measured and they were ranged from 160-245 microns in length and 116-225 microns in width. Therefore, the average size was 195×150 microns (Table III). In comparison, the above average metacercarial size was smaller than the size of metacercariae, 204×145 , 201×167 and 202×168 microns reported by Harinasuta, C. (1960) (7), Vajrasthira, S. (1961) (6) and Wykoff, D.E. (1965) (8), respectively. The authors believed that the metacercariae were observed in different areas and fishes that Vajrasthira, S. (1961) (6) and Wykoff, D.E. (1965) (8) examined were *Cyclocheilichthys* spp., *Puntius* spp., *Esomus* spp., and *Hampale* spp. The incidence of metacercarial cysts in fishes obtained from Tambol Sansai was higher than Tambol Chompoo, Amphur Sarapee (Table I). It might be mentioned that the author's findings are relatively comparable with findings reported by Na-Bang Xang et al (1969) (4). The incidence of cases of opisthorchiasis may be concluded

that the population around these areas have their meals with raw or insufficiently cooked of fresh water fishes haboured so many metacercarial cysts and caught from these areas. Besides, the evidence of metacercariae in fishes in Tambol SanKowng, Amphur SanKampang was quite high (Table I). Recently, there are no available reports on cases of opisthorchiasis in this area, but the authors would guess that the evidence of this disease in the population in this area might be high and interested.

Our findings that the incidence of metacercarial cysts were highest in *Puntius orphoides* and lowest in *Esomus metallicus* (Table II) were quite comparable with Wykoff's studies (1965) (8) that the incidence of metacercarial cysts he found in the *Puntius orphoides* and *Esomus metallicus* obtained in the Northeast. That is, the *Puntius orphoides* are the better second intermediate hosts than other fresh water fishes. In our study, we found that the metacercarial cysts were identified in 259 out of 512 fishes and 17 metacercarial cysts per fish (Table II). This incidence would be considerably high in comparison with Harinasuta's report (1961) (8) which the incidence was 36 per cent and the average cysts were 9 per fish investigated in six provinces (Udon, Sakol Nakorn, Nakorn Panom, Kalasin, Mahasarakarm and Khon Kean) in the Northeast. Because of flat

and damped areas and also good irrigation of Chiang Mai City may be the good reasons for breeding of the fishes that are the second intermediate hosts for opisthorchiasis. It was interesting to note that there were no opisthorchis ova detected in feces of three mice after 30 days in this experiment. The authors would express that the white mice are not practically unable for this particular study. The studies of Harinasuta, C. (1963-1964) (3) were noted that the opisthorchis ova were found in hamsters' stools after 22-27 days of infection and the infective incidence was 10-80 per cent, but in our study, the opisthorchis ova were observed in the same species of the experimental animals after 35-41 days and the infective incidence was 14-46 per cent (Table IV). According to this experiment, the hamsters were practically excellent. However, the longer duration of infection and lower infective incidence of our study are needed for further investigation.

The general morphologic studies of adult form of *Opisthorchis* spp. indentified from our experimental animals were carefully made and found that they were similar to the *Opisthorchis viverrini* which was lancet-shaped with rather small anterior end and blunt or rounded posterior end. There were no spines on the body surface. The oral sucker and acetabulum were the same size. The testes that com-

posed of two lobulated masses were located dorsally along the body length and distal to the ovaries. One of the testicular masses was slightly deviated from the other one. The ovaries were located proximal to the testes and the anterior one showed many lobulations in character. The vitelline glands were arranged in groups and located on both sides between the acetabulum and ovaries (Picture II). (1, 11, 12) By the above morphologic findings, the adult form of *Opisthorchis viverrini* was not sharply differentiated from the *Opisthorchis felinus*.

Conclusion :

In several areas in Chiang Mai Province, the metacercariae were detected in three species of fishes in Cyprinoid family. They were 388 of *Puntius leiocanthus*, 18 of *Puntius orphoides* and 106 of *Esomus metallicus*. The metacercarial cysts were observed in 233 of *Puntius leiocanthus*, 17

of *Puntius orphoides* and 9 of *Esomus metallicus*; therefore, the incidence was 50.5 per cent (259 out of 512 fishes examined). The average numbers of the metacercarial cysts in each fish were 3.5 minimum and 124.7 maximum. Because of the cooking habits of raw or medium fresh water fishes caught around the Northern areas for normal meals of the population, the epidemiologic problems of opisthorchiasis are urgent needed to be solved.

Acknowledgements :

The authors wish to express appreciation to Assistant Prof. Chucherd Sivasomboon, M.D., Dr. Chirasak Kamboonruang, M.D., Ph.D. and Mr. Kettrat Sookavat, medical technologist for their supports, advices and viewing manuscript. We would also thank to Mae-Jo Fishery Experimental Station, Amphur Sansai, Chiang Mai in identification of fishes.

Table I: Shows the evidence of the metacercariae of
some Tambols, Amphur SanKampang and S

Place	Species of fishes examined	Local name	Number of fishes examined
Tambol Chompoo, Amphur Sarapee	<i>Puntius leiocanthus</i> (Bleeker) <i>Esomus metallicus</i> (Ahl.) <i>Puntius orphoides</i> (Cuo. + Val.)	Pla Tapien Pla Siew Pla Gam Shum	1
Total			1
Tambol Sansai, Amphur Sarapee.	<i>Puntius leiocanthus</i> (Bleeker) <i>Esomus metallicus</i> (Ahl.) <i>Puntius orphoides</i> (Cuo. + Val.)	Pla Tapien Pla Siew Pla Gam Shum	
Total			1
Canals along the Lampang Chiang Mai High Way at twelveth kilometer, Amphur Sarapee.	<i>Puntius leiocanthus</i> (Bleeker) <i>Puntius orphoides</i> (Cuo. + Val.)	Pla Tapien Pla Gam Shum	1
Total			1
Tambol SanKowng, Amphur SanKam- pang.	<i>Puntius leiocanthus</i> (Bleeker) <i>Puntius orphoides</i> (Cuo. + Val.) <i>Esomus metallicus</i> (Ahl.)	Pla Tapien Pla Gam Shum Pla Siew	
Total			
Grand Total			5

of *Opisthorchis* spp. in cyprinoid fishes in
Sarapee, Chiang Mai Province.

Number of fishes examined	Numbers of fishes harboured metacercariae	Percentage of fishes harboured metacercariae	Number of metacercariae observed	Average numbers of metacercarial cysts per fish
109	28	25.6	142	5.0
37	4	10.8	14	3.5
6	5	83.3	289	57.8
152	37	24.2	445	12.0
71	54	76.0	957	17.7
68	5	7.9	81	16.2
2	2	100.0	216	10.8
141	61	43.2	1,254	20.5
186	138	73.8	1,447	10.4
9	9	100.0	1,123	124.7
195	147	75.3	2,570	17.4
22	13	59.0	48	3.6
1	1	100.0	19	19.0
1	—	—	—	—
24	14	58.3	67	4.7
512	259	50.5	4,336	16.7

including no

Species	Local Name
Puntius leiocanthus (Bleeker)	Pla Tapie
Puntius orphoides (Cuó. + Val.)	Pla Gam S
Esomus metallicus (Ahl.)	Pla Siew
Total	

and species of cyprinoid fishes that harboured metacercariae,

[illegible]

Table III: Shows the size of the living metacercaria

No.	Length 160 -- 245	Breadth 116 -- 225	No.	Length 160 -- 245	Breadth 116 -- 225
1	204	174	51	205	140
2	100	144	52	175	140
3	198	162	53	170	145
4	108	198	54	185	140
5	198	180	55	210	185
6	198	156	56	185	165
7	198	156	57	175	150
8	198	180	58	190	165
9	198	162	59	175	125
10	204	150	60	180	135
11	192	150	61	210	165
12	210	168	62	175	165
13	186	168	63	185	150
14	204	156	64	225	200
15	216	168	65	205	160
16	204	180	66	225	180
17	204	150	67	230	185
18	210	180	68	215	200
19	192	138	69	200	175
20	198	168	70	185	140
21	204	180	71	190	160
22	216	168	72	200	175
23	204	156	73	190	160
24	216	180	74	185	165
25	204	156	75	185	150
26	204	168	76	170	150
27	204	168	77	200	187
28	222	198	78	200	150
29	238	180	79	200	175

30	168	80	207	183
31	186	81	230	183
32	156	82	210	173
33	144	83	195	180
34	198	84	190	140
35	138	85	175	130
36	132	86	165	140
37	180	87	190	150
38	204	88	230	140
39	162	89	185	180
40	160	90	230	225
41	175	91	175	145
42	185	92	193	130
43	215	93	190	165
44	210	94	175	140
45	170	95	175	125
46	150	96	175	135
47	140	97	190	160
48	130	98	165	115
49	150	99	160	180
50	125	100	185	140
Mean			195.75	150.17

Table IV: Shows the duration and incidence

Date	Animals	Numbers of metacercarial cysts infested	Species of cyprinoid fishes harboured
Dec. 2, 69	White mice	22	<i>Puntius leiakanthus</i> , Tambol Chom
Dec. 9, 69	White mice	100	<i>Puntius leiakanthus</i> , Tambol Sansai
Dec. 9, 69	White mice	50	<i>Esomus metallicus</i> , Tambol Sansai
Dec. 19, 69	Hamster	30	<i>Puntius leiakanthus</i> , Tambol Sansai
	Hamster	30	<i>Puntius leiakanthus</i> , Tambol Sansai
Dec. 23, 69	Hamster	50	<i>Puntius leiakanthus</i> , Canals along C Lampang High Way, Amphur
Dec. 25, 69	Hamster	50	" " " "
	Hamster	50	" " " "
Jan. 6, 70	Hamster	50	<i>Puntius orphoides</i> , Canals along C Lampang High Way, Amphur
	Hamster	50	" " " "
	Hamster	50	" " " "
Jan. 7, 70	Hamster	50	<i>Puntius leiakanthus</i> , Canals along C Lampang High Way, Amphur

Incidence of Opisthorchiasis in the experimental Animals

Hosts and places	Opisthorchis ova observed in faeces in days	Date Sacrificed	Numbers of adult liver flukes	Incidence of adult liver flukes per cent	Remarks
Goat, Amphur Sarapee	--	--	--	--	Negative for Ova
Amphur Sarapee	--	--	--	--	"
Amphur Sarapee	--	--	--	--	"
Amphur Sarapee	41	Feb. 4, 70	14	46.6	
Amphur Sarapee	41	--	--	--	
Chiang Mai --	37	Feb. 12, 70	19	38.0	
Sarapee					
"	35	Feb. 10, 70	21	42.0	Expired
"	35	--	--	--	
Chiang Mai --	35	Feb. 2, 70	7	14.0	Expired
Sarapee					
"	35	--	--	--	
"	35	--	--	--	
Chiang Mai --	35	--	--	--	
Sarapee					



PICTURE I
METACERCARIA OF OPISTHOCHIS SPP.



PICTURE II
ADULT LIVER FLUKE

References :

1. Sadun, E.H. : Studies on *Opisthorchis viverrini* in Thailand, Am. J. Hyg. 62: 81-115, 1955.
2. Vajrasthira, S and Harinasuta, C: Studies on Helminthic diseases in Thailand J. of Med. Ass. of Thailand 40: 5, 309-340, 1957.
3. Annual Report of Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 1963 - 1964 p. 97.
4. Na-Bang-Xang et al: Studies of Intestinal Parasite in Amphur Sarapee, Chiang Mai Province, Chiang Mai Med. Bull. 8: 2, 1969
5. Annual Report of Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 1964 - 1965 p. 145.
6. Vajrasthira, S and Harinasuta, C and Komiya, Y: The Morphology of the metacercaria of *Opisthorchis viverrini* with Special Reference in the Excretory System, Ann. Trop. Parasite 55: 413-418, 1961.
7. Harinasuta, C and Vajrasthira, S. *Opisthorchis* in Thailand, Ann. Trop. Med. Parasit. 54: 100 - 105, 1960.
8. Wykoff, D.E., Harinasuta, C., Jattijudata and Winn, M.M., : *Opisthorchis viverrini* in Thailand - The Life Cycle and Comparison with *Opisthorchis felinus*, J. Parasitology 51: 207 - 214, 1965.
9. Harinasuta, C., Vajrasthira, S. and Jetanasen, S.: Metacercaria in Fishes in the Northeast, J. of Med. Ass. of Thailand 44: 9, 612-628, 1961.
10. Annual Report of Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 1962 - 1963 p. 61.
11. Leiper, R.T.: Note on the Occurrence of Parasites, presumably rare in man, J. London School Trop. Med. 1: 16 - 19, 1911.
12. Kerr, W.F.J.: Intestinal Parasites in Northern Siam, Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. 9: 82, 1916.



A SIMPLE METHOD FOR DETERMINATION OF SERUM METHOTREXATE *

Chairat Asavapaka, B.Sc. (Med. Tech.) *

Malinee Chaovapan, B.Sc. (Med. Tech.) **

Panja Kulapongs, M.D. ***

ABSTRACT

A simple bacteriological method for determination of methotrexate concentration in biological fluids is described. The principle of the technique is similar to the bacterial sensitivity test. The sterile filter paper discs with known concentration of methotrexate solutions and the test sera are placed on the test plates containing suspension of *Lactobacillus casei* in the suitable agar medium. The definite zones of inhibition of bacterial growth after 18 - 24 hours of the incubation at 37°C are recorded. The MTX calibration curve is obtained when the inhibition zones are plotted against the MTX concentration on the log paper. This calibration should be done each time of the determination. The better results obtained from the tomato juice agar medium, the home-made filter paper disc and a test volume of 0.01 ml. This method has proved satisfactory with the specimens obtained from animal experiment. It is recommended for clinical use due to its feasibility (can be carried out in any routine clinical laboratory), accuracy and inexpensive.

INTRODUCTION

Methotrexate (Amethopterin, 4-amino-¹⁴C-methyl-pteroylglutamic acid sodium) is of great value in the treatment of acute leukemia, trophoblastic tumors of the uterus (1, 2) and also in primary and

* The term paper for the partial fulfilment of the requirements for the Degree of Bachelor in Science (Medical Technology).

** Instructor, Clinical Microscopy Section.

*** Head, Clinical Microscopy Section, School of Medical Technology,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

secondary tumor (3,4). In the more recent reports methotrexate (MTX) has been shown to have enhanced biological activity when it is given by continuous 24 hour intra-arterial infusion rather than a single daily oral dose. Thus, it is of greater value in the treatment of various types of cancer, particularly in solid tumors. (5) The efficiency of MTX is limited partly due to its toxicity to the bone marrow and G.I. tract with rather narrow range of safety. Blood level of MTX is sometime essential for adjusting the suitable dose schedule.

The methods currently in used for the determination of MTX in various biological fluids are the bacteriological method (6), fluorometric technic (7) and radioenzymatic method (8). We are reporting our modification of the bacteriological technic which is more simple, much cheaper, can be carried out in any routine laboratory and accurate enough for clinical purpose.

MATERIALS

I. METHOTREXATE STOCK SOLUTION

Stock solution tubes containing 5 ml each of a MTX at a concentration of 1,000 ng/ml are prepared and then kept frozen at -40°C. By diluting this stock solution with distilled water (or preferably the

pooled normal serum or plasma) standards containing 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, and 500.0 ng/ml are prepared. These standard dilution are stored in the refrigerator at 4°C when not in use.

II. LACTOBACILLUS CASEI

Lyophilized *Lactobacillus casei* ** was resuspended in sterile water then inoculated in the transfer medium and incubated for 18 hours at 37°C.

III. FILTER PAPER DISCS

The special filter paper discs, 6.5 mm. diameter are prepared by cutting the Whatman filter paper No. 2 with a standard office paper puncher (but the commercially available ink blotcher is preferable). They are sterilized by autoclaving 15 minutes at 15 pounds pressure (121°C).

IV. THE ASSAY MEDIA

Two types of medium were experimented.

A. FOLIC ACID ASSAY PGA BROTH

Seventy five grams of Folic Acid Assay PGA Broth, *** 30 grams agar, and 20 ug of crystalline pteroylglutamic acid are added to 2,000 ml. of distilled water. This is heated to dissolve the agar then sterilized and aliquoted as described below.

B. TOMATO JUICE AGAR MEDIUM

Mix 51.0 gms. of tomato Juice Agar

* From Lederle Lab., Division of the American Cyanamid Co.,

** From Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.

*** From BBL, Division of Bioquest, Cockeysville, Md., U.S.A.

Medium* to 1,000 ml. of cold distilled water and heat to boiling to dissolve the medium completely.

The media are sterilized by autoclaving 15 minutes at 15 pounds pressure (121°C), cooled to 45°C in a water bath, and inoculated with 1 ml. of a 18 hour-old broth culture of *L. casei* per 1,000 ml. of media. After shaking thoroughly to mix the organisms throughout the media, 10 ml. aliquots are pipetted into the specially pressed, flat bottom Petri dishes (Pyrex dishes or disposable plastic dishes) 100 mm. diameter. Allow the media to solidify then kept in the refrigerator at 4°C. These plates are used within 1 to 96 hours.

METHODS

A standard calibration plate is prepared by placing 4 filter paper discs on the agar plate and delivering 0.01 ml. of one of the various standard solutions of MTX to each disc in duplicate. Since the disc absorbs moisture rapidly from the agar, it is essential that the solution be delivered to the disc immediately after it touches the agar. The plates are then incubated for 18-24 hour. The diameters of the zones of inhibition are measured and plotted against the concentration of MTX on the log paper to give a standard calibration curve.

An anesthetized dog was given 0.5ml. pentobarbital intravenously every hour. Five milligrams of freshly prepared MTX was given intravenous push within one minute period. Blood samples were clotted at intervals. One ml. of blood sample is allowed to clot, rimmed with a wooden applicator stick, centrifuged, and the serum removed. Full strength serum or 1/3 and 1/10 dilutions of these serum sampled in pooled normal sera are used for the study.

RESULTS

I. The comparison between 2 types of agar media.

The Tomato Juice Agar medium is better than the Folic Acid Assay PGA Broth because :

- a. It needs shorter incubation time, 18 hours rather than 24 hours or more as required when the latter is used.
- b. Although the calibration curve obtained from the former medium is not as steep as obtained from the latter (Fig. I) but the zones of inhibition readings are correlated to the concentrations better.
- c. Tomato Juice Agar medium is much cheaper.

II. Application of the method to the animal study.

After intravenous administration of

*From Difco Laboratories, Detroit, Mich., U.S.A.

MTX in dog, the highest blood level is obtained at 15 minutes. The disappearance of MTX occurred in 2 phases (Fig. II).

DISCUSSION

Methotrexate is the methylated analogue of aminopterin and exerts its primary effect by inhibiting the action of the enzyme, dihydrofolic reductase (DHFR). Therefore, it prevents synthesis of DNA and thus interferes with cell mitosis. Methotrexate has at least 20,000 times more affinity for DHFR than folic acid. (9)

The bacteriological method of determination of MTX in the biological fluids was first described by Burchenal et al (6) in 1951 and has proved its usefulness in clinical use. Our modification can be carried out in any routine clinical laboratory with limited equipments and budget. When the Tomato Juice Agar is used the calculated cost of the material required is approximately 0.25 Bht per specimen (in duplicate)

The optimum volume of specimen required for each disc is 0.01 ml. since the larger volume tends to overflow the filter paper disc and may cause distortion of the

inhibition zone. The accuracy of 0.01 ml. and 0.02 ml. specimen are otherwise comparable (Fig III). It is also noted that when the standard calibrations of MTX are made in pooled normal plasma or serum they will give the same size of inhibition zones but with more distinct diameters.

The Tomato Juice Agar medium is preferable due to its accuracy, better calibration curve, shorter incubation time and much cheaper cost. The results of the attempt to study the blood level of MTX in animal were comparable to those reported earlier. (6, 10)

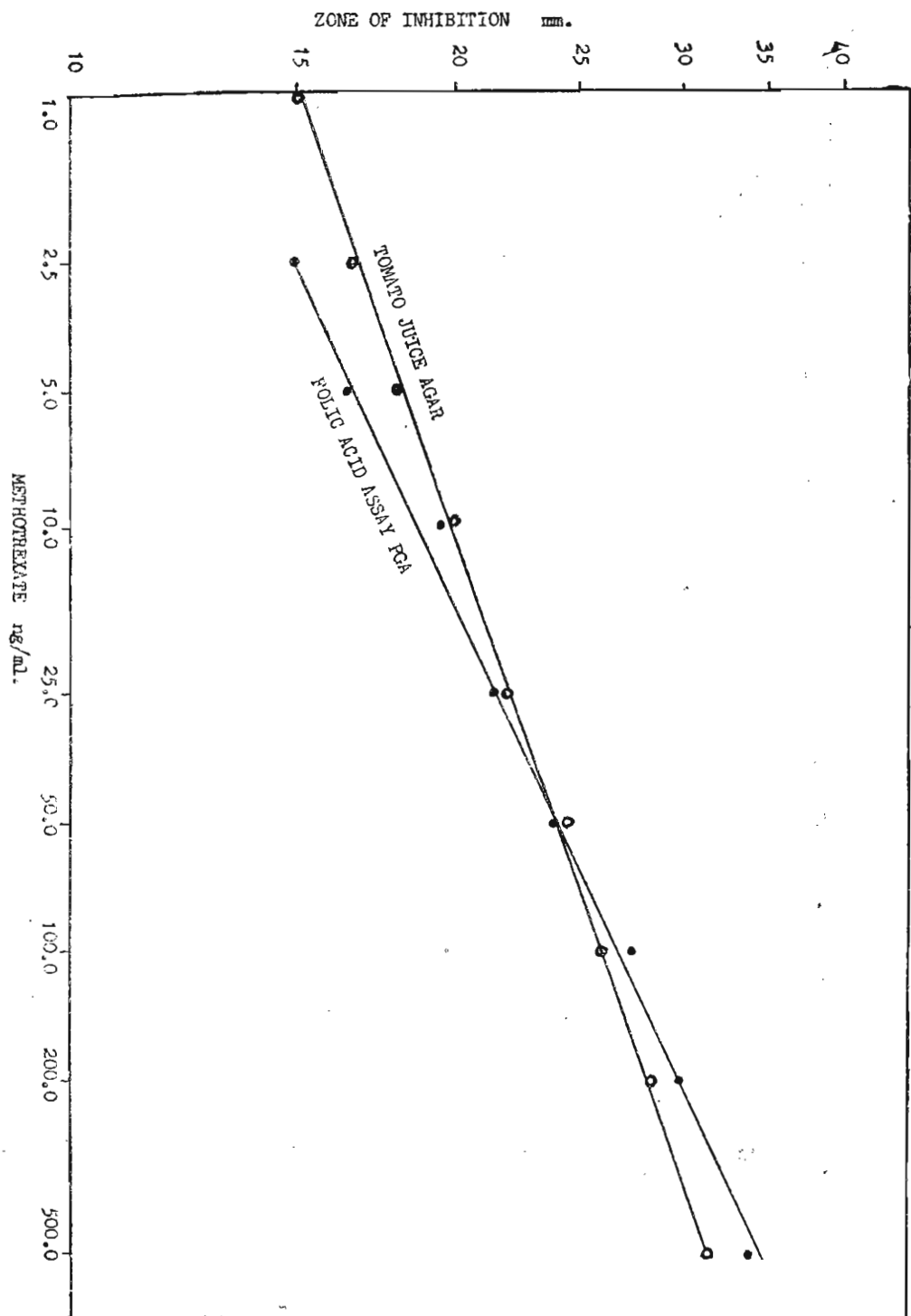
SUMMARY

A new modification of the bacteriological method of determination of Methotrexate, the anticancer drug, was described. The better medium for *L. casei* is Tomato Juice Agar Medium. The test can be carried out in any routine clinical laboratory with accuracy.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank Mr. N. Suvankruhasna B.Sc. (Med. Tech.) and Mr. P. Inboriboon M.Sc. for their valuable suggestions and assistance.

FIGURE 1.: CALIBRATION CURVES FROM DIFFERENT TYPES OF MEDIA.



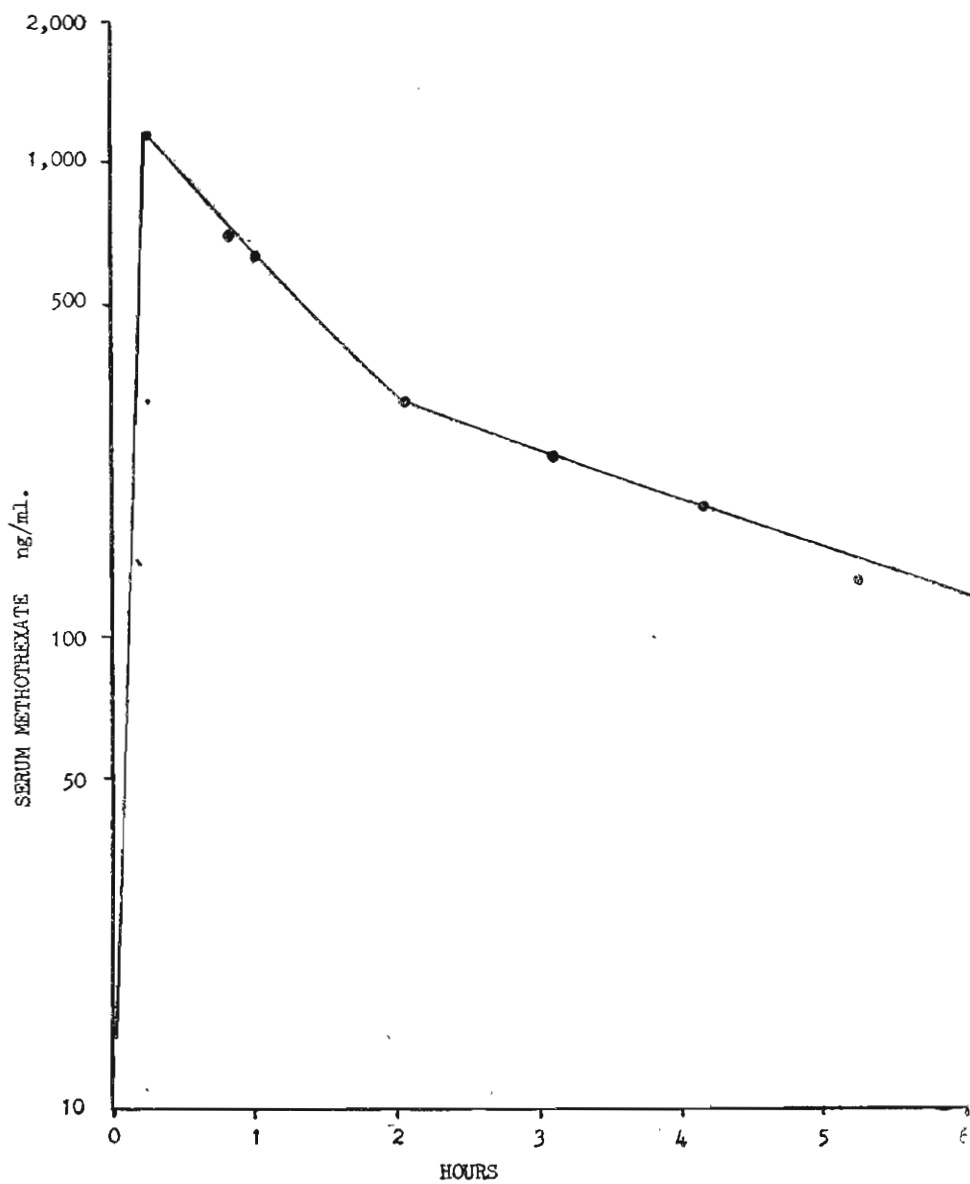
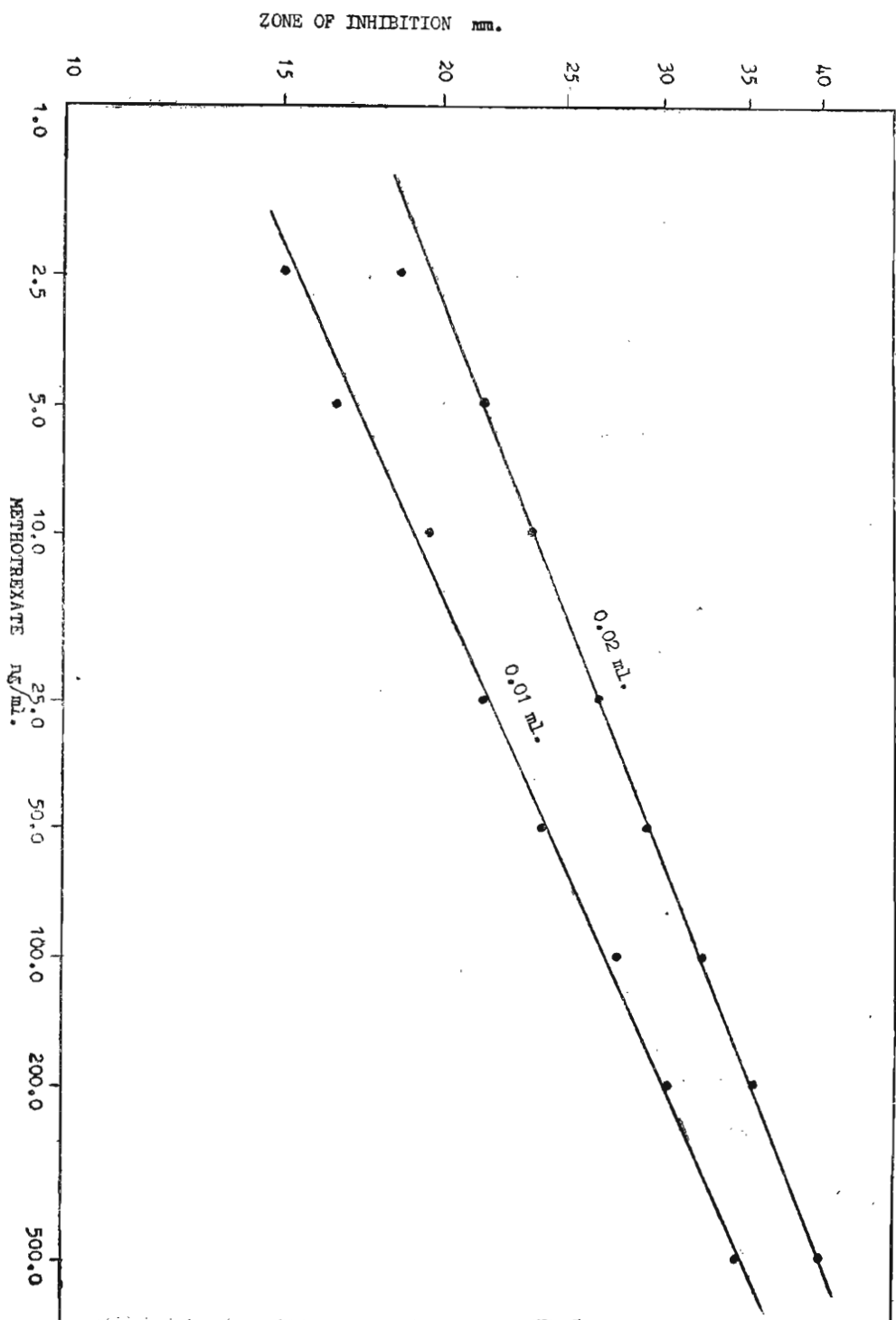


FIGURE II.: SERUM METHOTREXATE LEVELS AFTER INTRAVENOUS INJECTION

FIGURE II.: EFFECT OF DIFFERENT SIZE OF SAMPLES.



REFERENCES

1. Li, M.C., Hertz, R., and Spencer, D.B.: Effect of Methotrexate Therapy Upon Choriocarcinoma and Choriodenoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 93:361, 1956.
2. Hertz, R., Lewis, J., and Lipsett, M.B.: Five years Experience with Chemotherapy of Metastatic Choriocarcinoma and Related Trophoblastic Tumors in Women. *Amer. J. Obst. Gynec.* 82, 631, 1961.
3. Evans, A.E., D. Anglo, G.J., and Mitus, A.: Central Nervous System complications of Children with Acute Leukemia. An Evaluation of Treatment Methods. *J. Pediat.* 64:94, 1964.
4. Newton, W.A., Jr., and Sayers, M.D.: Intrathecal Methotrexate Therapy of Brain Tumors of Childhood. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.* 6:48, 1965.
5. Sullivan, R.D. et al: Clinical Effects of Continuous Intravenous and Intra-Arterial Infusion of Cancer Chemotherapeutic Compounds. *Cancer Chemother. Rep.* 16:499, 1962.
6. Burchenal, J.H., Waring, G.B., Ellison, R.R., and Reilly, H.C.: A Simple Method for Determination of Levels of Amethopterin in Blood and Urine. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 78:603, 1951.
7. Freeman, M.V.: A Fluorometric Method for the Measurement of 4-amino-10-methyl pteroylglutamic acid (Amethopterin) in plasma. *J. Pharm. Exp. Ther.* 120:1, 1957.
8. Rothenburg, S.P.: A Radioenzymatic Assay for Folic Acid Antagonists in Biological Fluids. *J. Lab. Clin. Med.* 66:294, 1965.
9. Werkeiser, W.C.: Biochemical, Cellular and Pharmacological Action and Effects of Folic Acid Antagonists. *Cancer Res.* 23:1277, 1963.
10. Liguori, V.R., et al: Effects of Different Dose Schedule of Amethopterin on serum and Tissue Concentrations and Urinary Excretion Patterns. *Clin. Pharmacol. Ther.* 3:34, 1962.



EXCRETION PATTERNS OF STEROIDS IN URINE
OF NORMAL ADULT THAI MALES AND PATIENTS
UNDERGOING TREATMENT
AT THE NAKORN CHIANG MAI HOSPITAL *

Andomsark Haesungcharearn, B.Sc. Hons. (Med Tech.) **

Muni Keoplung, M.D. ***

ABSTRACT

The pattern of excretion of 17-ketosteroids and in some cases 17-hydroxy corticosteroids in the urine of normal male volunteers and patients under treatment at the Nakorn Chiang Mai Hospital has been investigated. Rates of 17-ketosteroids excretion in normal Thai males have been found to be marginally lower than in European males. Patients with lesions in endocrine glands showed altered rates of excretion of 17-ketosteroids and 17-hydroxy corticosteroids. Patients suffering from more generalized metabolic disorders exhibited normal rates of steroid excretion. Male patients subjected to surgery showed a marked drop in the rate of excretion of 17-ketosteroids two or three days subsequent to surgery.

INTRODUCTION

Certain of the steroid hormones may be classified into two major groups, namely 17-ketosteroids (17-KS) and 17-hydroxy corticosteroids (17-OHCS), a classification

which depends on the presence of a ketone group or a hydroxyl group at the C-17 ring position. Important 17-ketosteroids found in human urine include androsterone (and isomeric forms), dehydroiso-

* From the Department of Clinical chemistry, The Term Paper for the Degree B.Sc. (Med. Tech.), the School of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, 1970.

** Present address: Biochemistry Department, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok.

*** Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

androsterone and estrone. Several pathological conditions have been found to increase either the number or concentration of 17-KS in urine (12). Important 17-hydroxy corticosteroids found in urine include cortisone, cortisol and 11-deoxycortisol

The pattern of synthesis and excretion of 17-ketosteroids is sex related. Thus, estrone is synthesized in females only. Secondly, in females androgens are synthesized only in the adrenal cortex, from corticosteroids. In the male, however, metabolites of testosterone account for one third of the total androgenic activity. This additional source thereby accounts for the slightly elevated androgen levels of males compared with females. The rate of excretion of androgens may therefore be used as an index of combined steroidal activity of both the adrenal cortex and testes in males, and of the adrenal cortex alone in the case of females. Indirectly the 17-ketosteroid excretion rates thus indicate the control activity of the anterior pituitary gland (1).

Adrenal androgens show an anabolic effect on protein metabolism, an effect which counterbalances the catabolic effects of glucocorticoids (3). Apart from maintaining a positive nitrogen balance, they also enhance the growth of pubic and

axillary hair, and in the female, growth of the clitoris. Androgens are of particular metabolic significance when synthesized in abnormally large amounts following enhanced ACTH levels due to some types of adrenocortical insufficiency (3).

With the exception of etiocholanolone, an isomeric form of androsterone, most of the 17-ketosteroids have androgenic activity. Chemical or colorimetric urine analyses of 17-ketosteroids are thus a reasonable indication of total androgenic activity (1), although accurate estimates have been found to require the use of a bioassay system. As illustrated in Table 1, 17-ketosteroid urine values in Europeans have been found to depend on age as well as sex (4).

Decreases in 17-ketosteroid urine values have been found in cases of hypopituitarism, some types of pituitary tumors, both male and female hypogonadism, adrenocortical deficiency (Addison's disease), hypothyroidism, malnutrition, anemia and anorexia nervosa. In all cases of nephritis and diabetic patients 17-ketosteroid excretion is markedly reduced. Increases in rates of excretion have been found in cases of adrenal cortical carcinoma, adrenal cortical hyperplasia and tumors of testicular interstitial cells.

Table I. PATTERNS OF 17-KS EXCRETION RATES
IN NORMAL EUROPEANS

	Category	Excretion (mg/24 hrs)	
		mean	range
Children	a) Less than 6 years	Less than 1	—
	b) Older than 12 years	As in adults	—
Women	a) Adult	10.2	5 to 15
	b) Pregnant		
	Early pregnancy	10.2	5 to 15
	Late pregnancy	—	5 to 20
	c) Climacteric	—	3 to 18
Men	a) Adult	15	8 to 20
	b) Older than 50 years	Less than 5	—

The synthesis of 17-hydroxy corticosteroids, unlike the 17-ketosteroids, is not sex related. They are also relatively more important in that they control of a wider variety of metabolic activities. Thus, overproduction of 17-hydroxy corticosteroids leads to profound alteration such as increases in protein catabolism and liver gluconeogenesis, for which reason the 17-hydroxy corticosteroids are often referred to as glucocorticoids. Overproduction of these hormones leads also to hypercholesterolemia and lipidemia, with subsequent abnormal fat distribution as in Cushing's syndrome. Calcium uptake from the gut

and osteoblastic activity in bone is also inhibited by high concentrations of glucocorticoids. At normal levels of synthesis glucocorticoids are involved, in addition, in the homeostatic regulation of the central nervous system, the control of gastric acidity, and the extent of skin pigmentation, this latter action being mediated by the depression of the melanocyte stimulating action (3) of both ACTH and intermedin (MSH).

In addition to the above pathological conditions, a wide variety of environmental factors such as muscular exercise, exposure to cold, trauma, burns, bacterial

infection, exposure to X-rays, and mental or emotional stress have all been found to modify the rate of synthesis of 17-hydroxy corticosteroids. In the case of "alarm stimuli" the response of the adrenal cortex follows elevated ACTH levels resulting from the hypothalamus controlled release of corticotrophin releasing factor (14). Surgical operations, with attendant excitement, fear, pain and possible hypoxia, have thus been found to modify adrenocortical activity in the immediate post-operative period (6,7,11,13).

The purposes of this investigation were several fold, Firstly, a comparison was attempted of the 17-ketosteroid excretion patterns of normal Thai males compared with published values for Europeans. Secondly, the effect of various conditions on 17-ketosteroid, and to a limited extent 17-hydroxycorticosteroid, excretion in both male and female hospital patients at Chiang Mai was determined. Lastly, in view of the well documented effects of surgery on 17-hydroxy corticosteroids synthesis (15,17), a limited number of patients were examined in relation to 17-ketosteroid excretion subsequent to surgery.

MATERIALS AND METHODS

A. Materials

Specimens were collected over full 24 hour periods from both volunteers and patients at the Department of Medicine and Surgery, Nakorn Chiang Mai Hospital.

When determining 17-KS, fifteen ml of concentrated HCl was added to each specimen as a preservative. Samples to be assayed for 17-hydroxy corticosteroids were maintained at 4°C in a refrigerator after the process of collection.

B. Methods

The analysis of 17-ketosteroids was performed using dinitrobenzene in methanolic potassium hydroxide (Zimmermann's Reaction). The steroids were first extracted from urine diethylether, which was then shaken several times with NaOH. The 17-hydroxy corticosteroids were assayed after chloroform extraction and pretreatment using phenylhydrazine hydrochloride in acid/alcohol solution (Porter-Silber Method). For further details of both methods see "Council on Clinical Chemistry of American Society of Clinical Pathologists, work shop in hormone technique" (5).

RESULTS

Table 2 illustrates the 17-ketosteroid excretion pattern in 10 normal Thai males, ages 21 to 32. The mean excretion rate was found to be 12.1 mg/24 hrs. within a range of 6.0 - 17.3 mg/24 hrs. The S.D. with these volunteers was determined to be 3.9. When compared with excretion rates in normal European males (mean 15 mg/24 hrs. range 8-20 mg/24 hrs. (4,18). it may be seen that the rate of excretion in Thai males was lower.

Table 3 shows the daily excretion rates of three male patients suffering from pituitary insufficiency, primary aldosteronism and carcinoma of the thyroid gland. In all cases it may be seen that 17-KS excretion is either below or in the lower range limit for normal male adults. The most extreme depression is evident in the patient suffering from pituitary insufficiency.

Table 4 tabulates similar data in female patients exhibiting a variety of clinical

symptoms. The results are grouped into two categories, namely those "disease" states in which 17-KS depression is not evident and those in which there is significant depression of 17-KS excretion. Thus Cushing's syndrome, general obesity and hypertension have no significant effect of 17-KS excretion. In contrast, hypopituitarism, Sheehan's syndrome and prolonged steroid medication all resulted in a marked depression of 17-KS excretion.

Table 2. NORMAL VALUES FOR THE URINARY EXCRETION OF 17-KETOSTEROIDS IN ADULT THAI-MALE.

Case No.	Age	17-KS (mg/24 hrs urine)	Urine Volume (ml/24 hrs)
1	22	17.3	1,140
2	21	15.5	1,200
3	30	8.4	2,250
4	21	10.4	1,940
5	32	11.3	1,430
6	25	16.0	2,280
7	25	8.16	900
8	25	15.48	1,580
9	26	12.31	570
10	29	6.0	630

Mean 12.1 mg/24 hrs

Range 6.0-17.3 mg/24 hrs

S. D. 3.9

Table 3. URINARY EXCRETION OF 17-KETOSTEROIDS

IN MALE PATIENTS OF VARIOUS DISEASE STATES.

Case No.	Age	Diagnosis	17-KS (mg/24 hrs urine)	urine volume (ml/24 hrs)
1	38	Pituitary insufficiency	1.68	4,340
2	48	1° Aldosteronism	6.90	810
3	58	Cancer of Thyroid	5.07	1,300

Table 4. URINARY EXCRETION OF 17-KETOSTEROIDS IN

FEMALE PATIENTS IN VARIOUS DISEASE STATES.

	Case No.	Age	Diagnosis	17-KS (mg/24 hrs urine)	urine volume (ml/24 hrs)
A. No significant 17-KS depression	4	35	Cushing's syndrome?	8.03	780
	5	14	Hypertension, possibly Cushing's syndrome	4.20	250
	6	18	Obesity	11.65	1,000
	7	67	Hypertension	5.20	400
	8	37	Hypertension	15.80	2,770
B. Significant 17-KS depression	9	27	Panhypopituitarism	2.64	600
	9	27	Panhypopituitarism (After Rx)	17.02	900
	10	15	Hypopituitarism	0.39	650
	11	40	Sheehan's syndrome	1.50	1,730
	11	40	Sheehan's syndrome (After ACTH)	0.70	780
	12	52	Prolonged steroid medication	0.27	1,440
	13	45	Hirsutism, Ovarian tumor	2.94	300

Table 5 indicates the 17-hydroxy corticosteroid excretion in one male and one female patient listed in Tables 3 and 4. The normal 17-hydroxy corticosteroid excretion rates in males and females are 3.6-11.6 and 3.5-7.5 mg/24 hrs (5) respectively. It may be seen that the excretion rate was within the normal range in the male patient suffering from primary aldosteronism. In contrast a depression in the 17-OHCS excretion rate can be seen in the female patient with Sheehan's syndrome. In this case there was no response after treatment with ACTH.

Table 6 presents analyses of 17-KS excretion rates in three male patients both prior to and subsequent to moderately severe surgery. For a variety of reasons

it was not possible to procure urine samples in all cases for the full 6 days both before and after surgical treatment. It is evident, however, that there is a marked drop in 17-KS excretion in all three patients 3-4 days after surgery. This observation is in agreement with study of 17-KS conducted on patients by Bennett and Moore(2). In the same study this author also reported that on the initial day, and perhaps second day after surgery, there was a transitory increase in 17-KS excretion prior to the marked decrease such as reported in the present study. There is a suggestion in the data of Table 6 of a similar transitory rise, although there were insufficient samples in the present study to be certain.

Table 5. URINARY 17-HYDROXY CORTICOSTEROIDS
EXCRETION IN PATIENTS OF VARIOUS DISEASE STATES.

Case No.	Sex	Age	Diagnosis	17-OHCS (mg/24 hrs)	urine volume (ml/24 hrs)
2	M	48	1° Aldosteronism	5.20	810
11	F	40	Sheehan's syndrome	2.69	1,730
11	F	40	Sheehan's syndrome (After ACTH)	2.03	780

Table 6, URINARY 17-KETOSTEROIDS EXCRETION IN MALE PATIENTS FOLLOWING SURGERY

Case	Diagnosis		Pre-Operative (days)						Post - Operative (days)					
			6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6
1	Cancer of Thyroid	mg/ 24 hrs Urine ml/ 24 hrs			5.07 1300	5.53 1310				6.29 860	4.47 820	3.19 620		
2	Hydrocele of both testes	mg/ 24 hrs Urine ml/ 24 hrs					10.50 1580	7.44 1880	7.05 1230		9.28 680	3.96 490	3.60 810	
3	Indirect inguinal hernia (right)	mg/ 24 hrs Urine ml/ 24 hrs	13.83 700	8.50 530	13.90 470			15.00 550		18.45 1030	3.97 480	6.72 410		

DISCUSSION

From the data presented (Table 2), it was found that the rate of excretion of 17-KS in Thai males (mean 12.1, range 6.0-17.3 mg/24 hrs) was lower than in European males (mean 15, range 8 to 20 mg/24 hrs) (4, 18). The significance of this observation is hard to assess, however, since the body weights of both groups was not determined. Thus, it is not possible to say whether this lower excretion rate reflects merely a difference in the mean body weight of the two groups, or an intrinsic genetic difference. Furthermore the values quoted may have undue variation due to sampling errors, since urine was collected by volunteers themselves and may not, at times, have represented the full 24 hrs urine volume. Due to difficulties in obtaining sufficient female volunteers, efforts to compare male and female 17-KS excretion rates in normal Thais were unsuccessful.

The lack of effect of Cushing's syndrome on 17-KS excretion in the one case examined is typical of mild cases of this syndrome. Thus, although there tends to be a slight increase in 17-KS excretion in such patients (8) the daily fluctuation in the values obtained from a series of 17-KS determinations on such patients overlaps the range commonly observed in normal subjects (13). Assays of 17-KS excretion rates in patients suspected of having

Cushing's syndrome are therefore of little practical use in most cases.

It is of interest that the 17-KS excretion rate in the one obese patient examined was within the normal range (5.0 to 15.0 mg/24 hrs (18)). It has been reported that obese patients with a higher than normal content of ketone bodies during the fasting period tend to have falsely high chromogen values when 17-OHCS are assayed by the Porter-Silber method (9). Normal values are obtained, however, when the organic extracting solvent is first evaporated prior to the colour reaction.

The low urinary excretion of 17-KS in patient with pituitary insufficiency (Table 3), panhypopituitarism and hypopituitarism (Table 4) is the result of depressed pituitary synthesis of ACTH and subsequent lack of stimulation of the adrenal cortex. In one case (Table 4) we found that the 17-KS excretion rate rose after medication, thus indicating that the adrenal cortex of this patient did not atrophy as a result of the lack of ACTH. In contrast, one patient exhibiting a select type of hypopituitarism termed Sheehan's syndrome was unresponsive when treated with ACTH. In this case both 17-KS (patient 11, Table 4) and 17-OHCS (patient 11, Table 5) excretion rates were unresponsive. Such data indicates strongly that the adrenal cortex of this patient had already atrophied as a result of the long

term absence of pituitary synthesized ACTH.

The low 17-KS excretion value obtained in the patient exhibiting Hirsutism (patient 13, Table 4) is atypical. Thus, Lipsett *et al.* reported that in idiopathic hirsutism there is dual androgen synthesis in both the adrenal cortex and the ovaries (which do not normally synthesize androgens) and that this combination causes an excess of androgen excretion (10). The predominant site of synthesis of androgen in patients suspected of dual ovarian androgen synthesis may be ascertained by use of suppressants of the adrenal cortex, or the compound pergonal which stimulates ovarian androgen synthesis.

The results indicating alterations in 17-KS excretion patterns subsequent to surgery are in agreement with a large body of papers indicating alterations adrenal cortical activity in the post operative period (eg. 3, 4, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 17). Although the decrease in 17-KS excretion rates is clearly evident from the 3rd post-operative day on, the rise on the first two days subsequent to surgery is not so convincing. In the male this is presumably because a portion of the androgens synthesized do not originate in the adrenal cortex. Much clearer patterns of change would be expected from studies of 17-OHCS levels

which are a direct measure of the activity of the adrenal cortex.

CONCLUSION

Urinary excretion rates of 17-KS in Thai males have been found to be marginally lower than in European males. The significance and basis of this observation is not known.

Patients with panhypopituitarism, or Sheehan's syndrome, or patient who had undergone prolonged steroid medication, were found to have lower urinary 17-KS excretion rates, and in some cases, lower excretion rates of 17-OHCS. Patient indicating hypertension rates.

In agreement with other workers, alterations in 17-KS excretion patterns were noted in male patients subsequent to surgical treatment.

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to thank Dr. Somchit Sukuprakarn M.D., Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for allowing access to the patients reported in the study, and the kind help of the nurses who collected the specimens. We also wish to thank Mr. Sawat Lungarsitte for his advice on methods of analysis, and Dr. Adrian J. Lamb, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University for his advice and help in preparing this paper.

REFERENCES

1. Anton, H.U., Doering, P., Eger, W., Fritze, E., Hollmann, S., Karte H., Kellner, H., Schoen, R., Schülze, G., Schwab, M., and Sudhof, H. Biochemical findings in the differential diagnosis of internal diseases. Amsterdam - London - New York, Elsevier Publishing Company, 1963.
2. Bennett, E.V., and Moore, F.D. Effects of surgical trauma and exogenous hormone therapy on urinary excretion of 17-Ketosteroids. *Surgical Forum* **52**, 551 (1951).
3. Bland, J.H. Clinical metabolism of body water and electrolytes. Philadelphia-London, W.B. Saunders Company, 1963.
4. Cantarow, A., and Trumper, M. Clinical Biochemistry. 6th ed. Philadelphia-London, W.B. Saunders Company, 1962.
5. Council on Clinical Chemistry of American Society of Clinical Pathologists. Work shop in hormone technique. Chicago, Illinois, Sept. 5-6, 1959.
6. Goldenberg, I.S. Simultaneous evaluation of thyroid hormone transport mechanisms and adrenocortical function during operation. *Surg. Gynec. & Obst.* **113**, 449 (1961).
7. Goldenberg, I.S., Rosenbaum, P.J., and Hayes, M.A. Patterns of thyroid adrenocortical response after operation. *Ann. Surg.* **142**, 786 (1955).
8. Hoffman, W.S. The Biochemistry of Clinical Medicine. 4th ed., Chicago. Year Book Medical Publisher, Inc., 1970. p. 682.
9. Kruger, F.A., Wieland, R.G., Maynard, D.E., Schachner, S.H., and Hamwi, G.J. Comparison of fluorometric corticoids and Porter-Silber 17-hydroxycorticoids during fasting. *Metabolism* **14**, 199 (1965).
10. Lipssett, M.B., and Korenman, S.G. Androgen metabolism. *JAMA.* **190**, 757, (1964).
11. Markley, K., Bocanegra, M., Ego-Aguirre, E., Chiappori, M., and Morales, G. Adrenocortical function after major surgery operation and thermal trauma in man. *Surgery* **47**, 389 (1960).
12. Mason, H.L., and Engstrom, W.W. The 17-Ketosteroid: Their origin, determination and significance. *Physiol. Rev.* **30**, 321 (1950).
13. Moore, F.D. Metabolism in trauma; The reaction of survival (editorial). *Metabolism* **8**, 783 (1959).
14. Moore, F.D., and Ball, M.R. The metabolic response to surgery. Springfield. Illinois, U.S.A. Charles C. Thomas, Publisher, 1955.

15. Moore, F.D. Steenberg, R.W., Ball, M.R., Wilson, G.M. and Myrden, J.A. Studies in surgical endocrinology. I. The urinary excretion of 17-hydroxy corticoids, and associated metabolic changes in cases of soft tissue trauma of varying severity and in bone trauma. *Ann. Surg.* **141**, 145 (1955).
16. Reddy, W.J. Modification of the Reddy-Jenkins-Thorn method for the estimation of 17-hydroxy corticoids in urine. *Metabolism* **3**, 489 (1954).
17. Sandberg, A.A., Eik-Nes, K., Samuels, L.T., and Tyler, F.H. The effects of surgery on blood levels and metabolism of 17-hydroxy corticosteroids in man. *J. Clin. Invest.* **33**, 1509 (1954).
18. Talbot, N.B. et al., *New England J. Med.* **223**, 369 (1940).



Air Sampling for Microorganisms in Operating rooms and Surgical wards, Nakorn Chiang Mai Hospital*

Panya Polpruksa B.Sc. (Med. Tech.) **

Netr Suwankrughasa B.Sc. (Med. Tech.) ***

Prayool Inboriboon B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc. ***

Kampol Panas-ampol M.D. ***

Abstract

The instrument used in this study was a S/P-TDL-Slit Sampler Model A. Blood agar plates were used as the primary isolation medium and only aerobic organisms were studied. Micrococcus species were found in greatest number, 30.2%. The predominant pathogenic organisms were Staphylococcus aureus, 3.4%, and Pseudomonas species, 2.8%. In surgical wards, both male and female, the incidence in November, 1970, was higher than in February, 1971. The operating rooms before, during, and after use, still yielded organisms, including pathogens.

Introduction

The bacterial population in air is very important because these organisms may be spread to many places and some cause infections in man. Some are saprophytic and some are pathogenic. The kinds and numbers of organisms are influenced by

many factors, especially environment and human activities. The bacterial population of the hospital is likely to be more dangerous than that of similar large institutions attended by a comparable number of healthy people. The most common pathogenic organisms that are usually found are

* This study was used in part for a term paper submitted in partial fulfillment of the requirements for the Bachelor degree of Science (Medical Technology). School of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

** Pra Pok Klao Hospital, Chantaburi.

*** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

Staphylococci, especially coagulase positive Staphylococci (1, 2, 3). Cohen et. al. (4) studied the organisms in operating rooms and found that 10 % of Staphylococci isolated were coagulase positive. Another pathogen commonly found is *Pseudomonas* spp. (5, 6, 7). So air sampling for microorganisms in the hospital is very important. This paper reports the kinds and numbers of microorganisms that were found in surgical wards and in a sterilized operating room before, during and after operations.

Materials and Methods

S/P-TDL Slit Sample Model A* (Figure I) was used. Blood agar plates were used as the primary isolation medium in this study. The instrument was sterilized before used. The Slit tube, which the air passes through to the plate, was sterilized by autoclaving, disinfectant was used on other parts. The detailed method of operating the instrument is given in the manual.

After collection, the blood agar plates were incubated at 37°C overnight and the colonies counted and identified by bacteriological methods (8).

Results

The air sampling was done in six sterilized operating rooms, before, during

and after an operation and in different units of surgical wards, both male and female wards. The study took place during November, 1970 - February, 1971, 116 samples were taken and 11,577 colonies were found. The volume of air in each sample are 20 ft³ (controlled by the instrument). The different kinds and numbers of the organisms isolated are shown in Table I. The predominant organisms were *Micrococcus* spp., 30.2 %, which usually are non-pathogenic. The pathogenic organisms found were *Staphylococcus aureus*, 3.4 %, and *Pseudomonas* spp., 2.8 %, a rather high incidence when compared with the other organisms isolated. Enterobacteria were also found but in smaller percentage. Among Staphylococci, 20% were *Staphylococcus aureus*.

The number of the organisms in different units of male and female surgical wards at different times are shown in Table II. The organisms in November, 1970, seem to be more numerous than in February 1971. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* species were found in every unit at all sample times.

In Table III are shown the number of organisms in the operating rooms under the different conditions. Before and after use, the previously sterilized operating

* Scientific Products, Division of American Hospital Supply Corporation,
General Offices - Evanston, Illinois.

rooms still yielded organisms, including pathogens. During operations the incidence was highest.

Discussion

There are many methods for doing air sampling (9). The simplest methods are done by opening the lid of the agar plate and placing it in the area of choice for a period of time or by using a sterile swab, rubbing the cotton tip in some dust, and then inoculating to isolation medium. However, these methods are only quantitative tests and are influenced by many factors such as air flow, rate of sedimentation, etc. Quantitative methods may be done by using some instrument such as Slit Sampler, Sieve Sampler, Andersen Sampler etc. S/P-TDL Slit Sampler, which is a Slit Sampler, was used in this experiment. By using this instrument, the volume of the air sample was known.

Micrococcus species were predominant in our study (30.2%). These organisms are usually found as normal flora of the human, especially on the skin. They are easily spread, so air pollution with these organisms will be high if the human activities increase. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* species were found in higher per cent than other pathogens. These organisms are easy to grow and very resistant to environmental influences (7). They may be easily spread to another places where they may cause infection (1,

2, 3, 4, 5, 6). Unfortunately, typing of these organisms and those isolated from patients was not done so we could not draw any epidemiologic conclusions about the strains isolated.

Some pathogens, although often isolated from patients (*Pneumococci*, beta-*Streptococcus* group A, etc.) were not found in our study. This may be due to many factors. For example, some organisms are sensitive and easy to kill when separated from the host and left to the mercy of the environment. Another factor might be that only blood agar plates were used as the primary isolation medium and incubated at 37°C aerobically, so that anaerobic or some fastidious organisms that need special media could not grow.

The incidence of organisms in the surgical wards in November was higher than February (Table II). Other than environmental factors, temperature, humidity, weather etc., and human activities this disparity may result from the fact that in November the weather is cold and people use more clothing, which provides a good place for organisms to lodge and then spread into the air.

In the operating rooms that were sterilized before and after use, we also found organisms, including pathogens. This means that our sterilization technique is not entirely reliable. However, it is impossible to destroy all of the organisms,

because disinfectants are used in this process.

From our study we can see that the kinds and numbers of the organisms in air depend on many factors. If air sam-

plings done often, especially in operating rooms and surgical wards, they can yield information that is useful in prevention of infections.

Table I. Total number and kinds of organisms found in 116 air samplings from surgical wards and operating rooms.

Microorganisms	No. of colonies	Per cent
Acromobacter species	269	2.3
Alcaligenes species	93	0.8
Aerobacter species	210	1.8
Bacillus species (not B. anthracis)	726	6.2
Diphtheroid	292	2.5
E. coli	11	0.1
Flavobacterium species	23	0.2
Fungi	644	5.5
Klebsiella species	23	0.2
Micrococcus species	3537	30.2
Pseudomonas species	327	2.8
Staphylococcus aureus	397	3.4
Staphylococcus epidermidis	1534	13.2
Streptococci (not beta Strept.)	117	1.0
Yeasts	433	3.7
Unidentified	2940	25.1
Total	11577	100

Table II. The number of organisms/20 ft³ found in air samplings from different units of male and female surgical wards at different times

Surgical ward	Unit	Organisms/20 ft ³	
		November, 1970	February, 1971
Male	General A	212 (S.aureus 12, Pseudo 6)	90 (S.aureus 2, Pseudo 4)
	General B	191 (S.aureus 6, Pseudo 3)	125 (S.aureus 1, Pseudo 3)
	Neurology	141 (S.aureus 16, Pseudo 4)	168 (S.aureus 3, Pseudo 2)
	Tetanus	120 (S.aureus 5, Pseudo 5)	81 (S.aureus 0, Pseudo 5)
	Urology	203 (S.aureus 6, Pseudo 9)	100 (S.aureus 1, Pseudo 2)
	average	173.4	112.8
Female	Urology	260 (S.aureus 9, Pseudo 8)	143 (S.aureus 12, Pseudo 10)
	General A	179 (S.aureus 3, Pseudo 3)	124 (S.aureus 2, Pseudo 4)
	General B	196 (S.aureus 2, Pseudo 4)	119 (S.aureus 3, Pseudo 3)
	Ped. Surgery	180 (S.aureus 2, Pseudo 3)	159 (S.aureus 2, Pseudo 3)
	Neurology	189 (S.aureus 6, Pseudo 4)	120 (S.aureus 6, Pseudo 2)
	Burn Unit	212 (S.aureus 10, Pseudo 16)	117 (S.aureus 2, Pseudo 10)
	average	202.66	130.33

Table III. The number of organisms/20 ft³ found in air samplings from the sterilized operating rooms under different conditions.

Condition	Organism/20 ft ³						average
	O.R. 1	O.R. 2	O.R. 3	O.R. 4	O.R. 5	O.R. 6	
Before operation	22	25	7	23	5	46	21.33
	S-2	S-3	-	S-1	-	S-4,P-1	
During operation	30	50	26	38	105	59	51.33
	S-7	S-3,P-1	S-3	S-4	S-3,P-5	S-4	
After operation	12	27	16	29	24	54	27.00
	-	P-1	S-1	S-1	S-1	S-1	

S = *Staphylococcus aureus*

P = *Pseudomonas* species

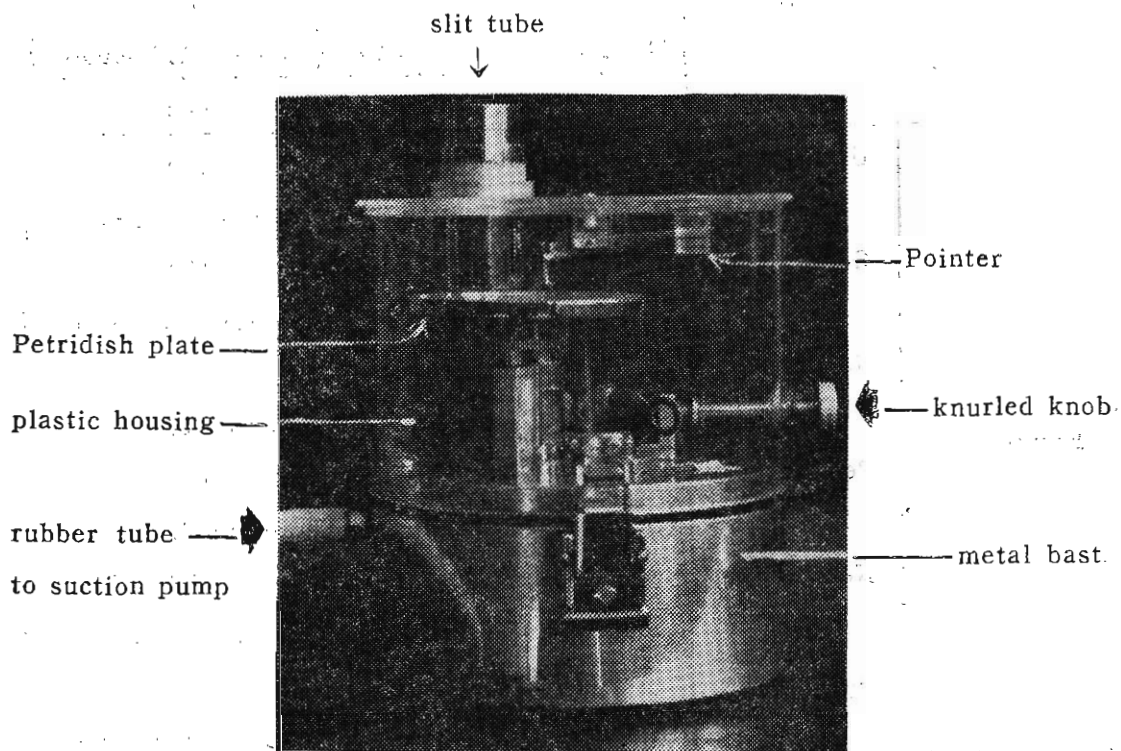


Figure I. S/P TDL Slit Sampler Model A

Acknowledgement

We wish to thank the Instructors of the Microbiology Department, Faculty of Medicine, for their support and encouragement in the course of this work, and also the staffs of the Surgical Department for

their cooperation in doing air sampling in the operating rooms and surgical wards.

Finally, we wish to thank Miss Patrisia Forsyth for her help in correcting the text of this paper.

References

1. Davis, J.H., Staphylococcal Infection in Surgical Patients, *Amer. Surg.*, 33: 642-649, 1967.
2. Williams, R.E., Epidemiology of Airborne Staphylococcal Infection, *Bact. Rev.*, 30: 660-674, 1966.
3. Barber, M., Hospital Infection Yesterday and Today, *J. Clin. Pathol.*, 14: 2-10, 1961.
4. Cohen, L.S., Fekety, F.R. Jr., and Cluff, L.E., Studies of the Epidemiology of Staphylococcal Infection. VI. Infections in the Surgical Patient. *Ann. Surg.*, 159: 321-334, 1964.
5. Luvira, A., and Talalak, P., An Outbreak of Pseudomonas Infection in Children's Surgical Wards, *Siriraj Hospital Gazette*, 18: 20, 1966.
6. Sandusky, W., Pseudomonas Infections: Sources and Cultural data in the General Hospital with Particular Reference to Surgical Infections, *Ann. Surg.*, 153: 996-1005, 1961.
7. Hurst, V., and Sutter, V.L., Survival of Pseudomonas aeruginosa in the Hospital Environment, *J. Infect. Dis.*, 116: 151-154, 1966.
8. Bailey, W.R., and Scott, E.G., *Diagnostic Microbiology*, 2nd Edition, 1966.
9. Hall, L.B., and Decker, H.M., Environmental aspects of Staphylococcal Infections Acquired in Hospitals. IV. Procedures Applicable to Sampling of the Environment for Hospital Use, *Amer. J. Public Health*, 50: 491-496, 1960.

ย่อความจากภาษาอังกฤษเบื้องต้น

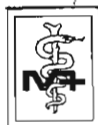
ในการศึกษาจำนวน และชนิดของ microorganisms ในอากาศในห้องผ่าตัด และ ดักสัณยกรรมทั้งชายและหญิง กระทำโดยใช้ เครื่องมือ S/P-TDL Slit Sampler Model A. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อ ครั้งแรกคือ Blood agar plate และศึกษา เฉพาะพวก aerobic เท่านั้น

จากการศึกษาปรากฏว่า เชื้อที่พบมากที่สุด คือพวก Micrococcus spp. ซึ่งพวกนี้ตาม ปกติแล้วจะอาศัยอยู่ตามผิวหนังหรือเสื้อผ้าของ คนทั่วไป จึงมีโอกาที่จะปลิวไปในอากาศได้ ง่าย และพวกนี้ส่วนมากไม่ทำให้เกิดโรค เชื้อ ที่สามารถทำให้เกิดโรค ที่เราพบที่สำคัญ ได้แก่

Staphylococcus aureus และ *Pseudo-*

monas spp. ซึ่งทั้งสองตัวนี้นับว่าสำคัญ เพราะว่ามันทนต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีชีวิต อยู่ได้นาน และอาจจะติดต่อไปถึงผู้ป่วยอื่นได้

จำนวนของเชื้อที่พบในแต่ละเวลายังแตกต่างกันออกไปด้วย โดยที่ในเดือนพฤศจิกายน จะมีจำนวน microorganisms ในอากาศมากกว่าเดือนกุมภาพันธ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม ต่างๆ สำหรับในห้องผ่าตัดนั้นปรากฏว่า หลังจากทำความสะอาดแล้ว ไม่ว่าก่อน หรือ หลังใช้ เรายังสามารถพบเชื้อได้ ซึ่งมีทั้งที่ทำให้เกิด โรค และไม่ทำให้เกิดโรค ส่วนในระหว่าง ผ่าตัดจะมีเชื้ออยู่มากที่สุด (51.3 colonies/20 ft³).



COMPARISON OF MEDIA FOR GROWTH OF THE FASTIDIOUS ORGANISMS *

Pensri Vannareumol, B.Sc. (Med. Tech.) **

Kampol Panas-ampol, M.D. **

Abstracts

The purpose of this study was to determine the effect of different media on the shape of the growth curves of certain fastidious bacteria. Beta streptococci group A, Pneumococci and Haemophilus influenzae were inoculated into Tryptic soy broth, Tryptic Soy broth with 1% Yeast extract, Heart Infusion broth, Tryptose Phosphate broth and Nutrient broth.

The tests were carried out using 0.1 ml. of 18-24 hrs. broth, then incubating at 37°C on a Burton Kahn Shakes. After 2 hrs., 4 hrs., and 6 hrs. particle density was determined in nephelometer units using a Coleman Nepho-Colorimeter. The growth curves were plotted on semi-log paper with logarithm of Nephelometer units against time. The results showed that Beta streptococci group A grow best in Tryptic Soy broth with 1% Yeast extract, Pneumococci grow best in Tryptose Phosphate broth. Haemophilus influenzae were unable to grow in these broths because of the absence of hematin and DPN.

Introduction.

All biological system, from microorganisms to man, share a set of nutritional requirements with regard to the chemicals necessary for their growth and normal functioning. The microorganisms require

the following substantiates this and illustrates the great diversity of nutritional types. (7)

1. All living organisms require a source of energy. Some forms of life, namely green plants, are capable of employing ra-

* The Term Paper for the Degree B.Sc. (Med. Tech.) The School of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai.

** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai.

diant energy. Forms of life incapable of utilizing radiant energy (e.g., animal life) rely upon oxidations of chemical compounds for their energy.

2. All living organisms require carbon in the form of CO_2 , and some require additional organic carbon compounds such as sugars and other carbohydrates.

3. All living organisms require nitrogen in some form. Some types are atmospheric nitrogen, some thrive on inorganic nitrogen compounds, and naturally occurring organic nitrogen compound.

4. All living organisms require sulfur and phosphorus. Some types require organic sulfur compounds, some are capable of utilizing inorganic sulfur compounds, and some have the unique capacity of utilizing elementary sulfur. Phosphorus is usually supplied as phosphate.

5. All living organisms require several metallic elements such as sodium, potassium, calcium, magnesium, manganese, iron, zinc, copper, phosphorus, and cobalt for normal growth.

6. All living organisms contain vitamins and vitamin-like compounds.

7. All living organisms require water for growth. For bacteria all nutrients must be in solution before they can enter the organisms.

[Considering of the requirements of bacterial growth, media can be grouped into :

1. Solid media. The solid media contain agar, serum albumin, or gelatin.

2. Liquid media. The main composition of the media is water. There is no agar in this type of media.

3. Semi-solid media. This media contains a smaller percentage of agar or gelatin than solid media.

The groups of media as mentioned will be divided into subgroups according to the purposes of assays and special requirements for growth of some organisms. (2, 5, 6).

1. Enriched media. The media is special for growth of fastidious organisms. It contains blood, serum or extract from plants and animals tissues.

2. Selective media. This type of media is used for selective growth of some microorganisms, especially gram negative bacilli. The media contains specific chemical substances, such as crystal violet, which inhibit the growth of gram positive bacteria.

3. Differential media. The media contains some substance that can be used for making a distinction between organisms. For instance blood agar media can differentiate bacteria that produce a hemolytic zone from a bacteria that cannot produce a hemolytic zone.

4. Assay media. The media is useful for vitamins, amino acid and antibiotic assays.

5. Media for enumeration of bacteria.

The media is useful for the detection of bacteria in milk and water.

6. Media for characterization of bacteria. This type of media contains a specific substance, cystine tellurite for example, that produces characteristic appearance in bacteria grown on the medium. *Corynebacterium diphtheriae* colonies will be black on the surface of cystine tellurite medium.

7. Transport media. The media contains oxidation and reduction protective agents. It supports life but not growth of bacteria before culture.

8. Maintenance media. The media is used in preservation of bacteria in the living state.

Distilled water is very important for preparing media (7). Tap water may be used (5) if it had low mineral content. Copper will inhibit the growth of bacteria. The pH of media is also important for the growth of bacteria. Fluid media (7) should have pH adjusted before it is transferred to tubes, flasks, or bottles in suitable volume and covered with cotton plugs, plastic caps or metal caps. Generally the media is sterilized by autoclaving.

Growth of bacteria requires optimal temperature for incubation. The optimal temperature is usually between 35°-37°C. Some bacteria require special conditions, including increased CO₂ atmosphere, unusual acid or alkaline pH conditions, etc.

Material and Method.

Three organisms, Beta streptococci group A, Pneumococci, and Haemophilus influenzae were used. They were obtained from stock cultures.

Media 1. Tryptic soy broth. (Difco)

2. Tryptic Soy broth with 1% Yeast extract. (Difco)

3. Bacto Heart infusion broth. (Difco)

4. Tryptose Phosphate broth (Difco)

5. Nutrient broth. (Difco)

These media were prepared according to manufacturer's directions.

Test tube. Screw cap tubes, 20 mm. x 150 mm, were used. These tubes were calibrated with a Coleman Nephro-Colorimeter using barium sulphate solution and reading Nephelometer units or Opacity units. The tubes for use had a variation not more than $\pm .02$. When calibrated, the tubes were washed with distilled water, autoclaved and dried. 10 c.c of broths was added to each tubes.

3-4 colonies of Beta streptococci group A from a blood agar plate were inoculated into 5 ml. of tryptic soy broth or 5 ml. of heart infusion broth and incubated at 37°C, 18-24 hours.

0.1 c.c of 18-24 hours broth culture was transferred into tryptic soy broth, tryptic soy broth with 1% yeast extract, heart infusion broth, tryptose phosphate broth, and nutrient broth respectively. Nephelometer units were read and then

the tubes were incubated at 37°C on a shaker (Kahn Shaker Burton Manufacturing Company, Los Angeles U.S.A. Model No. (430). Set at 180/min.

Assay of Coleman Nepho-Colorimeter.

The following method was used.

1. Adjust dials and knobs as follows.

GALV coarse - fully clockwise.

GALV fine - fully clockwise.

BAL - black scale at zero.

STD - any position.

BLK - fully clockwise.

2. Insert "Number 35" standard tube (well mixed), (prepare by used barium sulphate solution equivalent to a 1:10 dilution of Mc. Number 1). Cover with light shield.

3. Adjust illuminated pointer to read 35 on the black scale, with coarse and fine adjustment.

4. Insert "blank" tube containing the broth to be used in the test.

5. Adjust illuminated pointer to zero with BLK control.

6. Read unknown sample.

7. When reading exceed 85% on the unknowns, insert Number 35 tube again and adjust to 17.5% or 10% using the coarse and fine adjustment knobs. Multiply all readings thereafter by 2 or 3.5 respectively.

Reading of Broth Cultures.

The 1st reading was taken after inoculating organisms into broth and mixing.

The 2nd reading was taken after incubation on the Kahn shaker for 2 hrs.

The 3rd reading was taken after incubation on the Kahn shaker for 4 hrs.

The 4th reading was taken after incubation on the Kahn shaker for 6 hrs.

The same procedure was repeated for *Pneumococci* and *Haemophilus influenzae*.

Results

Table 1 shows the growth of *Beta streptococci* group A and *Pneumococci* in tryptic soy broth medium.

Table 2 shows the growth of *Beta streptococci* group A and *Pneumococci* in tryptic soy broth with 1% yeast extract.

Table 3 shows the growth of *Beta streptococci* group A and *Pneumococci* in bacto heart infusion broth.

Table 4 shows the growth of *Beta streptococci* group A and *Pneumococci* in tryptose phosphate broth.

Table 5 shows the growth of *Beta streptococci* group A and *Pneumococci* in nutrient broth.

Graphs were plotted for growth of the organisms on semi-log paper using the average nephelometer units against time for incubation.

Figure 1 is the graph for the growth of *Beta streptococci* group A in the broths.

Figure 2 is the graph for the growth of *Pneumococci* in the broths.

Haemophilus influenzae is a fastidious organisms, requiring an infusion medium.

enriched with blood or hemoglobin (X factor) and DPN or TPN (V factor). So it was unable to grow in these broths.

Discussion

Beta Streptococci, Pneumococci and *Hemophilus influenzae* are among the fastidious organisms commonly isolated from patients. These organisms need enriched media for their growth. Selection of the proper media for cultivation is very important, and the organisms generally grow poorly in liquid media.

Table I-V show that Tryptic soy broth containing 1% yeast extract supported growth of beta Streptococci group A better than other liquid media. Peptones in this medium are derived from soy bean, and the medium very useful in culturing beta-Streptococci, especially for typing, since medium containing peptone from animal sources may induce some beta-Streptococci to produce an active proteolytic enzyme which destroys M substance. Besides the medium used, there are other factors that stimulate growth rate of the organisms. William F. Vincent and Kathleen J. Lisiewski (1) found that beta-Streptococci group A would grow 4-5 times better if broth cultures were incubated with shaking at 37°C. This is confirmed in our experiment; if incubated without shaking, the organisms grew very poorly.

Before measurement of growth by Nephelometer could be determined, cultures had to be incubated at least six hours, while only two hours were required in "shaking" incubation.

Pneumococci grow best in Tryptose phosphate broth; however, growth is very slow. *Hemophilus influenzae* do not grow in any liquid medium tested, because these media lack the X and V factors needed for their growth.

The growth was determined by Nephelometer, using a Coleman Nephro-Colormeter. This method is easy and not time consuming. However, there are some disadvantages. For example, the method can be applied only to bacterial populations of relatively high density. Accurate measurements require suspensions containing ten million or more bacteria per milliliter. Also, turbidity of cultured broth may result from other factors, such as increases only in the size and shape of the organisms, contamination etc.

From our experiment, we can see that media used in cultivation of the organisms is very important. In good laboratories, quality control of media should always be done (3, 5, 8), because some lots of the medium or the same lot prepared at different times may not support the growth of some organisms.

TABLE 1

Shows the growth of Beta streptococci group A and Pneumococci
in Tryptic soy broth medium.

Organism	Incubation time in hours			
	0	2	4	6
Beta Strep. group A 1	0	6	55	304.5
„ „ 2	0	3	29	108
„ „ 3	0	3	11	48
„ „ 4	0	2	13	91
Average	0	3.5	27	113
Pneumococci 1	0	00	00	13
„ 2	0	00	00	18
„ 3	0	00	00	24
„ 4	0	00	00	24
Average	0	00	00	20

0 = No reading

00 = Growth insufficient to obtain reading

TABLE 2

Shows the growth of beta streptococci group A and Pneumococci
in Tryptic soy broth with 1 % Yeast extract

Organism	Incubation time in hours			
	0	2	4	6
Beta Strep. group A 1	0	3	114	588
„ „ 2	0	5	33	470
„ „ 3	0	3	19	59
„ „ 4	0	2	20	185.5
Average	0	3	47	325.6
Pneumococci 1	0	00	2	39
„ 2	0	00	9	41
„ 3	0	00	7	40
„ 4	0	00	9	45
Average	0	00	7	41

0 = No reading

00 = Growth insufficient to obtain reading

TABLE 3

Shows the growth of Beta streptococci group A and Pneumococci
in Bacto Heart infusion

Organism	Incubation time in hours			
	0	2	4	6
Beta strep. group A 1	0	6	84	206.5
„ „ 2	0	3	12	27
„ „ 3	0	3	6	13
„ „ 4	0	4	18	126
Average	0	4	30	93
Pneumococci 1	0	00	1	1
„ 2	0	00	2	3
„ 3	0	00	1	2
„ 4	0	00	1	1
Average	0	00	1.25	1.75

0 = No reading

00 = Growth insufficient to obtain reading

TABLE 4

Shows the growth of Beta streptococci group A and Pneumococci
in Tryptose Phosphate broth

Organism		Incubation time in hours			
		0	2	4	6
Beta Strep. group A	1	0	6	102	574
"	2	0	5	56	250
"	3	0	4	22	76
"	4	0	6	25	157.5
Average		0	5	51	264
Pneumococci	1	0	00	35	82
"	2	0	00	5	45
"	3	0	00	20	90
"	4	0	00	40	96
Average		0	00	25	78

0 = No reading

00 = Growth insufficient to obtain reading

TABLE 5

Shows the growth of Beta streptococci group A and Pneumococci
in Nutrient broth medium

Organism	Incubation time in hours			
	0	2	4	6
Beta strep. group A 1	0	2	2	2
„ „ 2	0	2	2	2
„ „ 3	0	1	2	2
„ „ 4	0	2	2	2
Average	0	1.75	2	2
Pneumococci 1	0	00	00	00
„ 2	0	00	00	00
„ 3	0	00	00	00
„ 4	0	00	00	00
Average	0	00	00	00

0 = No reading

00 = Growth insufficient to obtain reading

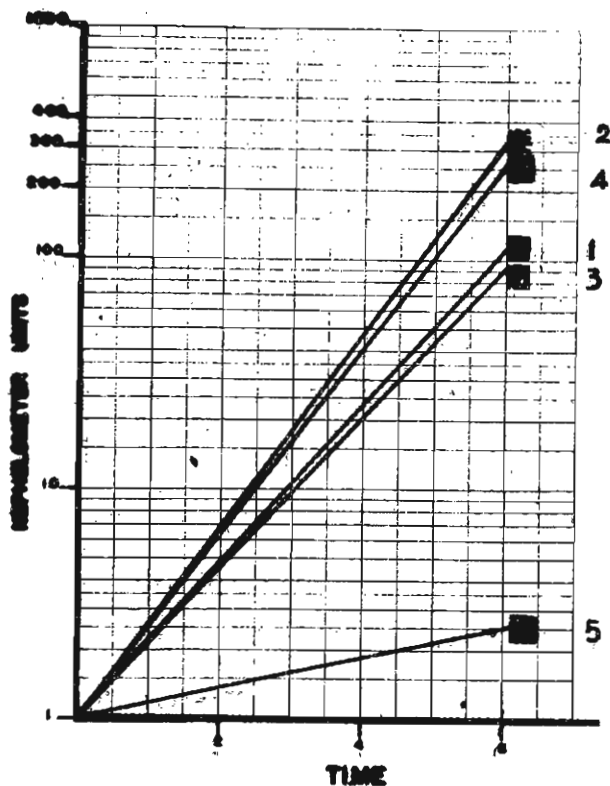


Figure 1

Is the graph for the growth of Beta streptococci group A. in the broths.

1. Tryptic Soy broth
2. Tryptic Soy broth with 1%YE
3. Heart Infusion broth
4. Tryptose Phosphate broth
5. Nutrient broth

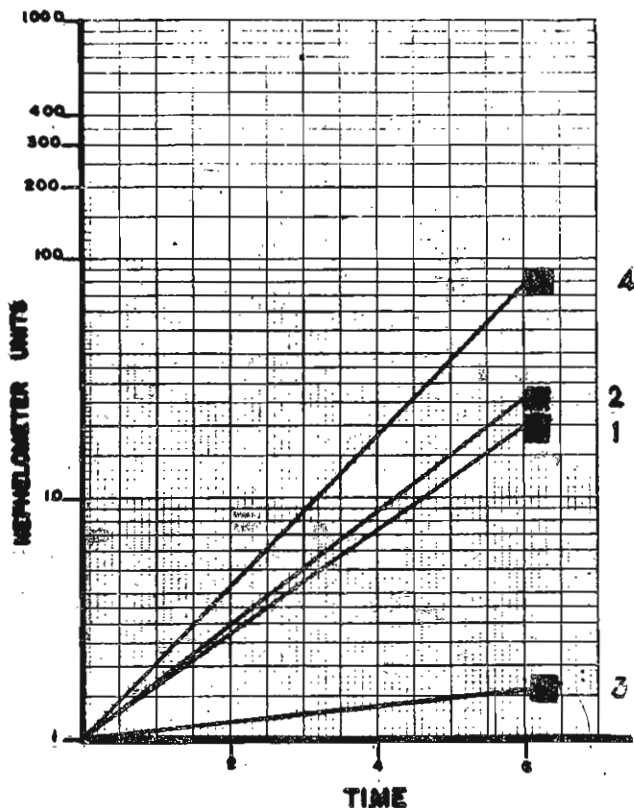


Figure 2

Is the graph for the growth of Pneumococci in the broths.

1. Tryptic Soy broth
2. Tryptic Soy broth with 1%YE
3. Heart Infusion broth
4. Tryptose Phosphate broth

ข้อเรื่อง

จากการเลี้ยงเชื้อ Beta streptococci group A, Pneumococci และ Haemophilus influenzae ใน media 5 ชนิด คือ Tryptic soy broth, Tryptic soy broth with 1% Yeast extract, Heart Infusion broth, Tryptose Phosphate broth และ Nutrient broth โดยใช้ 0.1 c.c. 18-24 hrs. broth culture ของเชื้อดังกล่าวใส่ลงไปใน broth จนครบชุด หลอดละ 0.1 c.c. นำไป incubate 37°C. บน Burton Kahn Shaker ใน incubator

แล้วนำมาวัดความขุ่นเป็น Nephelometer units ด้วยเครื่อง Coleman Neph-Colorimeter หลังจาก incubate ครบ 2 hrs., 4 hrs. และ 6 hrs. ตามลำดับ พบว่าหลังจาก incubate ครบ 6 hrs. Beta streptococci เจริญได้ดีที่สุดใน Tryptic Soy broth with 1% Yeast extract. Pneumococci เจริญได้ดีใน Tryptose Phosphate broth และ Haemophilus influenzae ไม่สามารถจะเจริญใน Broth ชุดนี้ได้.

References

1. Vincent W.F. and Kathleen J. Lisiewski, Applied Microbiology, 18:954-955, 1969.
2. Barry, A. American J. of Med. Tech. 33:1, 1967.
3. B.B.L. Manual of Products and Lab Procedures Fifth edition 1969, Maryland, U.S.A. p. 5-58.
4. Bailey and Scott, Diagnostic microbiology, second edition 1966, Saint Louis, U.S.A. p. 118 & 155.
5. Cruickshank, R. Medical Microbiology, 11th edition 1968, p. 724.
6. Harris and Coleman, Diagnostic Procedures and Reagents; 4th edition 1963. p. 105 & 191.
7. Pelczar and Reid, Microbiology, 2nd edition 1958, Japan. p. 79-86.
8. Russel, R.L. and Etal, Quality Control in Microbiology. Tech. Bul. Reg. Med. Techno 39:195-200, 1969.



ย่อ และ รีวิวเอกสาร

"Use of A New Reducing Agent, Metamizol, in Determining Inorganic Phosphorus in Blood and Urine"

Fayez K. Guirgis and Yehia A. Habib,
Clin. Chem. 17:78-81, Feb, 1971

Colorimetric methods โดยทั่วไปที่ใช้ในการหาปริมาณ inorganic phosphorus นั้น อาศัยการใช้ reducing agents ไป reduce phosphomolybdic acid เกิด molybdenum blue ทั้งสิ้น แต่ละวิธีใช้ reducing agents แตกต่างกันไป การหาปริมาณ inorganic phosphorus ใน serum และ urine โดยใช้ metamizole (methampyrone) เป็น reducing agent เป็นวิธีใหม่ สำหรับใน serum นั้นทำโดย deproteinize serum ด้วย trichloroacetic acid ก่อนแล้วผสม protein-free filtrate ที่ได้กับ metamizol solution และ molybdic acid ดำเนินวิธีการเดียวกันกับ working phosphate standard solution และน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็น blank อ่านค่า absorbances หลังจากทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ที่ wavelength 680 milimicrons ในระหว่าง 10-60 นาที ที่เกิดขึ้นจะจางลงประมาณ 1% ส่วน urine นั้นก่อนทำต้องเจือจาง

ด้วยน้ำ 100 เท่า หรืออย่างน้อย 25 เท่า แล้วทำให้เกิดสีด้วยวิธีการทำนองเดียวกัน การคำนวณผลทำได้สองวิธีคือ คำนวณจากค่า absorbances ที่อ่านได้ หรืออ่านผลจาก calibration curve ผลที่ได้โดยวิธีนี้เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ hydroquinone, ascorbic acid, aminonaphtholsulfonic acid หรือ elon เป็น reducing agents พบว่าไม่แตกต่างกัน เมื่อใช้ metamizol เป็น reducing agent แทน reducing agents ดังกล่าวในแต่ละวิธี พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างไปจากการใช้ reducing agent ตัวเดิม วิธีนี้มี reproducibility ดี และไม่ถูก interfere โดย pathological urinary constituents เช่น glucose, lactose, galactose, acetone และ bile รวมทั้งไม่ถูก interfere โดยยาพวก salicylates, cortisone, sulfanilamide, penicillin, tetracycline หรือแม้แต่ตัว metamizol ที่ใช้เป็นยาแต่อย่างใด

จันจวี ศิริวิทยาการ

B.Sc. (Med. Tech.)

“Direct Photometric Determination of Globulin in Serum”

Harry Goldenberg and Patricia A. Drewe,
Clin. Chem. 17: 358-362, May, 1971.

ค่าของ serum globulin มีความสำคัญในการใช้เป็นหลักสำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของ protein metabolism ในโรค multiple myeloma, carcinoma และ infectious disease หลายชนิด การหาค่า serum globulin โดยการลบค่า serum albumin ออกจากค่า total serum protein นั้น ทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย ค่า albumin และ total protein ที่ผิดพลาดเพียงเล็กน้อย จะทำให้ค่า globulin ที่คำนวณได้ผิดไปจากที่เป็นจริงมาก อาศัยพื้นฐานที่ดัดแปลงมาจาก Hopkins-Cole reaction โดยใช้ glyoxylic acid condenses กับ tryptophan residues ใน globulin เกิดสีม่วง ทำให้สามารถหาปริมาณ serum globulin โดยตรงได้ ในการทำให้ serum เพียง 20 microliters ผสมกับ globulin reagent ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง cupric sulfate pentahydrate, glacial acetic acid, glyoxylic acid monohydrate และ concentrated sulfuric acid แล้วต้มในน้ำเดือด 4 นาทีหรือใน heating block ที่ 100 °C 5 นาที เพื่อให้เกิดสี ดำเนินวิธีการ

เดียวกันกับ globulin standard หลังจากเขย่าให้เย็นแล้ว อ่านค่า absorbances ที่ wavelength 540-570 milimicrons ใช้ globulin reagent เป็น blank สีที่เกิดจะคงอยู่อย่างน้อย 2 ชั่วโมง คำนวณหาค่าปริมาณของ serum globulin จากการเทียบค่าความเข้มข้นของ standard กับค่า absorbances ของ standard และ serum unknown ที่อ่านได้ การหา serum globulin โดยวิธีนี้เป็นวิธี one-tube, one-reagent system ทำได้ง่าย, สะดวก, ใช้ serum จำนวนน้อย และมี reproducibility ดี พวก free tryptophan, albumin, bilirubin, lipemia และ mild hemolysis interfere ต่อผลที่ได้ น้อยมาก หรือไม่ interfere เลย วิธีนี้เป็นวิธี precision $\pm 3\%$ ที่ 95% confidence limits ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับทางสถิติกับวิธี salt fractionation ของ Wolfson et al, (Amer. J. Clin. Pathol. 18, 723 (1948) พบว่าไม่แตกต่างกัน ค่าปกติของ serum globulin ในคนหาค่าได้โดยวิธีนี้มีความระหว่าง 2.5-3.6 gm/100 ml serum

จันทร์ ศิริวิทยาการ

B.Sc. (Med. Tech.)

An Improved Method for Measuring Blood Concentration of Phenylpyruvic Acid

by S.P. Coburn, J.D. Mahuren,
and R.W. Fuller

From Clinical Chemistry Vol. 17, No. 5
May, 1971

Phenylketouria ซึ่งเป็น inherited disease Characterized โดยมี metabolic error ที่ไม่สามารถเปลี่ยน phenylalanine ให้เป็น tyrosine ได้เมื่อจำนวน phenylalanine สูงขึ้นก็จะถูก deaminated ให้เป็น phenylpyruvic acid (PPA) ค่า PPA ใน blood ใน urine excretion จะสูงขึ้น

ส่วนมากเราใช้วัด PPA ใน urine โดย ferric chloride reaction ซึ่งส่วนมากเป็น qualitative method มีบางคนดัดแปลงให้เป็น quantitative บ้างเหมือนกัน แต่วิธี ferric chloride นี้ lack specificity เนื่องจากมี large variation ในการ excrete PPA ใน urine เรามักจะไม่สามารถ detect PPA ได้ใน random specimen จึงมีวิธีหา PPA ใน plasma ซึ่งผู้ใช้ ferric chloride reaction กับ plasma แต่มีข้อเสีย คือต้องใช้ plasma จำนวนมาก และสีที่เกิด instable และ lack specificity

Knox & Pitt ได้พบวิธี PPA analy-

sis in blood โดยใช้วัด formation of a yellow complex ระหว่าง enol form กับ borate ion

ผู้เขียนได้ใช้ principle เดียวกับ Knox & Pitt แต่ได้ adapted วิธีให้ accurate simple ขึ้น โดยใช้ plasma+NaCl+conc. HCl. แล้ว shake กับ ethylacetate ตามเวลาที่กำหนดให้ แล้วนำ ethyl acetate extract ที่ได้ ไป shake กับ phosphate buffer อีกครั้ง แล้วจึงนำ phosphate buffer นั้น มาทำปฏิกิริยากับ borate buffer ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ complex เกิด complete แล้ววัด absorbance ที่ 298 mu ใน ultra violet spectrophotometer เทียบกับ standard phenylpyruvic acid.

พัทธราภรณ์ ชมเชิงแพทย์

B.Sc. (Med. Tech.), C (ASCP)

A mild case of infection due to *Vibrio cholera* classical Type Ogawa.

Banerjee, L.N. Indian Med. J. 65: 92-93, 1971

คนไข้เป็นเด็กชายอายุ 2 ปี ไม่เคยเดินทางออกจากกาลกัตตา เกิดมีอาการท้องเดินอย่างอ่อนวันละ 2-3 ครั้ง ออจระเป็นน้ำสีเหลือง มีอาการเป็นครั้งคราว คือวันที่ 30.12.

60., 26. 4. 67 และวันที่ 25. 7. 67 เด็ก
ไม่มีอาการอื่นที่สื่อให้เห็นว่าเป็นโรคหิวาห์
เช่น ไม่มีอาเจียน ได้เก็บอุจจาระมาเพาะเชื้อ
ปรากฏพบเชื้อ *Vibrio cholera classical*
Tybe ogawa เด็ก^{นี้}ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีน
มาก่อนเลย และเด็ก^{นี้}ได้เป็น carrier เชื้อ
หิวาห์^{นี้}เป็นเวลานาน.

เนตร สุวรรณคุณาสัน

B.Sc. (Med. Tech), Cert. in Imm.

**Rabies in a child diagnosed by a new intra-
vitam Method, the cornea test**

by E. Cifuentes, E. Calderon and G. Bijlenga
From J. Trop. Med. & Hyg. 74:23-25, 1971

จากรายงานเมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม 2513
มีเด็กชายอายุ 6 ปี ได้เข้ามารับการรักษาที่โรง
พยาบาลเค็ว ประเทศเม็กซิโก โดยเด็ก^{นี้}ถูก
สุนัขบ้ากัดที่ขาขวา ประมาณหนึ่งเดือนมาแล้ว
อาการของเด็ก มีไข้ 38 องศาเซลเซียส มี
อาการหายใจขัด ปวดที่หน้าท้อง เจ็บคอ ทาน
อาหารและดื่มน้ำไม่ได้ มีอาการแพ้

Cornea test ทำหลังจากเด็กเข้าโรงพยา-
บาลได้ 2 ชั่วโมง โดยเอาสไลด์ตัดเบาๆ ลง
บนคอร์เนียทั้งสองข้าง แล้วเอาสไลด์ไป fixed
ในน้ำยาอะซิโตนนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ
ห้องย้อมด้วยวิธี Direct fluorescent anti-
body test โดยใช้ anti-rabies conju-
gate (purified hyperimmune horse

globulin and fluorescein isothiocya-
nate) แล้วนำสไลด์ไปดูด้วยกล้อง Fluores-
cence microscope ปรากฏผลได้ผลบวก

หลังจากเด็กตายได้เอา สมอง, ต่อม^{นี้}น้ำลาย,
กล้ามเนื้อหัวใจ, นิล^{นี้}เข้าหนู ปรากฏว่าหนูตาย
ภายใน 13 วัน และเอาสมองหนูไปทำ Immu-
no fluorescence ได้ผลบวก ส่วนไต เอา^{นี้}นิล
เข้าหนูแต่หนูไม่ตาย เมื่อหา Antibody ก็ไม่
พบ Antirabies ในเลือดของหนู.

เนตร สุวรรณคุณาสัน

B.Sc. (Med. Tech), Cert. in Imm.

**Rapid Test for Urease and Phenylalanine
Deaminase Production**

by Grace Mary Ederen Jackie H. CHU and
Donna J. Blazeovic
from Applied Microbiology, Vol. 21, No. 3,
March 1971.

Vassiliadis และ Politi ได้คิดวิธีทดสอบ
หาการเกิดของ urease และ phenyla-
lanine deaminase ใน tube เดียวกันโดย
ใช้เวลาการ incubate ของเชื้อ 24 ชม. แต่
ผู้เขียนได้ดัดแปลงใหม่ให้เป็น rapid test.
โดยใช้เวลาของการ test เพียงไม่เกิน 5 ชม.
ส่วนประกอบของ Media มีดังนี้

Yeast extract 1 gm, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
2 gm, NaCl 3 gm, $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ 1.2 gm,
 $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ 0.8 gm, 1-phenylalanine

2.5 gm or DL-phenylalanine 5.0 gm, deionized water 997 ml.

เอาทั้งหมดมาผสมกัน ต้มในน้ำเดือดดำ
จำเป็น ภายหลังจาก Media เย็นแล้ว เติม
Urea ลงไป 5 gm, phenol red solution
3.5 ml. (0.5 gm of phenol red, 0.1 N. NaOH 20 ml, deionized water 230 ml) final pH ควรจะเป็น 6.8 Solution
ที่ได้ทั้งหมดจนเามา sterile โดยการกรอง
จากนั้นจึงแบ่งใส่ tube ขนาด 13×100 mm.
tube ละ 0.3 ml. เก็บไว้ที่ -20°C

วิธีใช้เอา media ที่ freeze ไว้ ตั้งทิ้ง
ไว้ให้ละลายก่อน แล้วจึง inoculate เชื้อจาก
TSI ลงไปขนาดเต็ม loop แล้ว incubate
ที่ 35°C อ่านผลภายใน 1, 2, 3, 4 หรือ
5 ชม.

การอ่านผล Urease positive media
จะเป็นสีชมพูแก่ ถ้าเป็นสีชมพูอ่อน Urease
จะ negative หลังจากอ่านผล urease reac-
tion แล้วจึงเติม 1 หรือ 2 หยดของ 1% HCl
media จะเป็น acid ได้สีเหลือง แล้วจึงเติม
2 หยดของ 10% FeCl_3 ลงไป ถ้ามีสีเขียว
เกิดขึ้นภายใน 10 วินาที แสดงว่า Phenyla-
lanine Deaminase positive แต่ถ้า me-
dia ยังคงเป็นสีเหลืองแสดงว่าผล negative

จากการทดลอง Urea-phenylalanine
rapid test นี้ใช้ Proteus 254 species
พบว่า *P. mirabilis* ทั้งหมด 104 strain
และ 45 strain ของ *P. vulgaris* ให้ผล
urease positive ใน 1 ชม. *P. morganii*
51 ราย ให้ urease positive 50 strain
ใน 1 ชม. อีก 1 strain ให้ผล positive
ใน 2 ชม. และ *P. rettgeri* 44 ใน 54
strain ให้ผล urease positive ใน 1 ชม.
นอกนั้นให้ผล positive ใน 2 ชม. และทั้ง
หมดให้ผล phenylalanine deaminase
positive ใน 1 ชม.

สำหรับ *Providencia* ทั้งหมด 25 strain
ให้ผล urease negative และให้ phenyla-
lanine deaminase positive ใน 1 ชม.

ส่วนเชื้อ genus อื่น ๆ ของ family
Enterobacteriaceae จำนวนทั้งหมด 1,016
strains ให้ผล phenylalanine deaminase
negative ในจำนวนนี้ 87% ของ *klebsiella*
ให้ urease positive ใน 4 ชม. และ 90%
ของ *Enterobacter* จะให้ urease nega-
tive ส่วนเชื้ออื่นๆ ที่เหลือจะให้ผล urease
negative หมด.

สุชาติ ศิริกุล

B.Sc. (Med.Tech.)



ข่าว

แต่งตั้งอาจารย์ที่ปรึกษา

ประจำปีการศึกษา 2514

คำสั่งคณะแพทยศาสตร์ ที่ 22/2514
เรื่อง แต่งตั้งอาจารย์ที่ปรึกษาประจำปีการศึกษา
2514 สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์
ที่ปรึกษาชั้นปีที่ 1

อาจารย์ อัญชลี กิตติชนม์ธวัช

อาจารย์ อัมพารัตน์ ชุมรม

ที่ปรึกษาชั้นปีที่ 2

อาจารย์ พัตรภรณ์ ชมเชิงแพทย์

อาจารย์ มานี เชาวพันธ์

อาจารย์ นันทยา วัยวัฒนะ

อาจารย์ บุญพะเยาว์ เลาหะจินดา

ที่ปรึกษาชั้นปีที่ 3

อาจารย์ ดำรง พิญดานนท์

อาจารย์ สุวีระ รณวิชัย

ที่ปรึกษาชั้นปีที่ 4

อาจารย์ สวัสดิ์ ลังการสิทธิ์

อาจารย์ ไพโรจน์ สภาวจิตร

หัวหน้าโครงการ

จัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์

คำสั่งมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ 462/2514
เรื่องโครงการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์ ด้วย

สภามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้มีมติเห็นชอบ
ในหลักการให้จัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์ จึง
ได้แต่งตั้งให้ อาจารย์ชั้นพิเศษนายแพทย์ ชัย-
โรจน์ แสงอุดม เป็นหัวหน้าโครงการจัดตั้ง
คณะเทคนิคการแพทย์ และให้ใช้เลขที่หนังสือ
ออกของโครงการจัดตั้งคณะฯ คือ ที่ สร. 2508
(ทน.) เพื่อความสววกในการดำเนินงานและ
การติดต่อประสานงานของโครงการดังกล่าว ใน
ขณะที่ยังไม่ได้รับอนุมัติให้จัดตั้งคณะตามกฎ-
หมาย

โครงการเกี่ยวกับการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์

โครงการนี้ได้เข้าที่ประชุมสภามหาวิทยาลัย
เมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2513 สภาเห็นชอบ
ด้วยกับโครงการนี้ และดำเนินเรื่องต่อไป
ยังสภาการศึกษาและกำลังรับพิจารณาเรื่องอยู่ที่
สภาการศึกษา เมื่อสภาการศึกษาเห็นชอบด้วย
ก็จะเสนอเรื่องเข้า ก.ม. และต่อไปถึงคณะ
รัฐมนตรีและต่อไปตราพระราชกฤษฎีกาออกมา
โครงการคณะนี้ก็ควรจะได้รับการจัดสรรงบประมาณ
ตามโครงการพัฒนามหาวิทยาลัย สำหรับหัว
หน้าโครงการที่จัดตั้งขึ้น มีหน้าที่ที่จะดำเนิน
การให้เป็นรูปร่างเท่านั้น และท่านคณบดีฯ ได้

เสนอให้หัวหน้าโครงการเข้าประชุมคณะบดีของมหาวิทยาลัย แต่ไม่มีสิทธิ์ออกเสียงเนื่องจากเหตุนี้จึงสมควรที่จะนำโครงการย่อย โดยเฉพาะการแบ่งส่วนราชการเป็นการภายในไปยังมหาวิทยาลัย สำหรับสำนักงานเลขานุการคณะยังไม่จำเป็นในขณะนี้ ภาควิชาต่างๆ ที่ขอเสนอ มี 4 ภาควิชา เพื่อให้ครบองค์ประชุมกรรมการคณะฯ ตามพระราชบัญญัติมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2512 และให้งานที่จะต้องรับผิดชอบเป็นไปโดยเรียบร้อย คือ-

1. ภาควิชาเคมีคลินิก (Clinical Chemistry)
2. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก (Clinical Microbiology)
3. ภาควิชาคลินิกัลไมโครสโคปี (Clinical Microscopy)
4. ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก (Clinical Immunology)

สภาอาจารย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาจารย์ของโครงการคณะเทคนิคการแพทย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับเลือกเป็นสมาชิกสภาอาจารย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเภทสมาชิกโดยการเลือกตั้งจากอาจารย์ของภาควิชาเทคนิคการแพทย์ 2 ท่าน คือ-

อาจารย์ เนตร สุวรรณคุณหาสน์
อาจารย์ สวัสดิ์ ลังกาสีห์

อาจารย์หัวหน้าฝ่ายนักศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์

คำสั่งคณะแพทยศาสตร์ ที่ 43/2514 เรื่อง แต่งตั้งอาจารย์หัวหน้าฝ่ายนักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ อาจารย์เนตร สุวรรณคุณหาสน์ ได้รับการแต่งตั้งให้เป็นอาจารย์หัวหน้าฝ่ายนักศึกษาของโครงการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์

เลื่อนชั้นและแต่งตั้งข้าราชการ

ตามคำสั่งผู้รักษาการในตำแหน่งอธิการบดี ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2514 เกี่ยวกับการเลื่อนชั้นและแต่งตั้งข้าราชการในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปรากฏว่า อาจารย์ของภาควิชาเทคนิคการแพทย์ ได้รับการเลื่อนชั้นและแต่งตั้งดังนี้-

นายไพโรจน์ สภาจิตร ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นตรีอันดับ 3 ขึ้น 1500 บาท ขึ้นเป็นข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นโทอันดับ 1 ขึ้น 1500 บาท และแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งอาจารย์โท ภาควิชาสรีรวิทยา

นายสุชาติ ศิริทูล ข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นตรีอันดับ 2 ขึ้น 1300 บาท ขึ้นเป็นข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นโทอันดับ 1 ขึ้น 1300 บาท และแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งอาจารย์โทภาควิชาเทคนิคการแพทย์

แต่งตั้งข้าราชการพลเรือน

มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นพิเศษ ในมหา-

วิทยาลัยเชียงใหม่ สำนักนายกรัฐมนตรีตามประกาศลงวันที่ 29 กรกฎาคม 2514 ปรากฏว่า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ชัยโรจน์ แสงอุ้ม หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์ และบรรณาธิการวารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ ได้รับการแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งอาจารย์ชั้นพิเศษ หัวหน้าภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

แต่งตั้งข้าราชการพลเรือน

ประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี เรื่องแต่งตั้งข้าราชการพลเรือน โดยมีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้งข้าราชการพลเรือนสามัญชั้นพิเศษ ในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำนักนายกรัฐมนตรี ให้ดำรงตำแหน่งดังต่อไปนี้.—

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง อรุณ สันตกุลสิต ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ในวิชาอายุรภาคศาสตร์

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ บริบูรณ์ พรพิบูลย์ ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ในวิชาชีวเคมี

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ ประยุทธ์ ฐิตะสุด ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ ในวิชาปรสิตวิทยา

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ชาญ สถาปนกุล ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ ในวิชาอายุรศาสตร์

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ หม่อมเจ้าอำนอร์สวัสดิ์ สวัสดิวัตน์ ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ ในภาควิชาสูติศาสตร์

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ อาวุธ ศรีสุภะ ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ ในวิชากุมารเวชศาสตร์

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิทย์ มณีเกษม ดำรงตำแหน่งศาสตราจารย์ ในวิชาพยาธิวิทยา

คณะบดีคณะแพทยศาสตร์คนใหม่

จากรายงานการประชุม หัวหน้าภาควิชา และสมาชิกสภาอาจารย์โดยการเลือกตั้งเพื่อหยั่งเสียงผู้เห็นสมควรเสนอแต่งตั้งเป็นคณะบดีคณะแพทยศาสตร์ เมื่อวันที่ 8 กันยายน 2514 ณ ห้องประชุมคณะแพทยศาสตร์ ผู้ที่ได้รับคะแนนเสียงสูงสุด คือ ศาสตราจารย์ นาวาอากาศเอกนายแพทย์ ตะวัน กังวานพงศ์ ซึ่งทางมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จะได้เสนอชื่อ ศาสตราจารย์ นาวาอากาศเอก นายแพทย์ตะวัน กังวานพงศ์ ให้สภามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อพิจารณาเสนอแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง คณะบดีคณะแพทยศาสตร์สืบต่อไป

งานเลี้ยงต้อนรับผู้สำเร็จการศึกษา

สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย ได้จัดงานเลี้ยงต้อนรับผู้สำเร็จการศึกษาเทคนิคการแพทย์ และรังสีเทคนิคที่สำเร็จจากมหาวิทยาลัย

วิทยาลัยเชียงใหม่ และมหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2513--2514 ณ ห้องอาหารของโรงแรมราชศุภมิตร ถนนหลานหลวง ในวันเสาร์ที่ 18 กันยายน 2514 เวลา 19.00 น. มีผู้สำเร็จการศึกษาไปร่วมงานอย่างคับคั่ง และงานดำเนินไปด้วยความเรียบร้อย

หัวหน้าภาควิชาในโครงการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์

ตามคำสั่งมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ 772/2514 ลงวันที่ 17 กันยายน 2514 เรื่อง แต่งตั้งข้าราชการทำหน้าที่หัวหน้าภาควิชาในโครงการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ นั้น ข้าราชการผู้ได้รับการแต่งตั้งให้ทำหน้าที่หัวหน้าภาควิชาในโครงการจัดตั้งคณะเทคนิคการแพทย์ มีดังนี้--

1. รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ กัมพล พันธ์อำพล ทำหน้าที่หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ จีรศักดิ์ คำบุญเรือง ทำหน้าที่หัวหน้าภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มณี แก้วปลั่ง ทำหน้าที่หัวหน้าภาควิชาเคมีคลินิก
4. อาจารย์นายแพทย์ ป๋วยจะ กุลพงษ์ ทำหน้าที่หัวหน้าภาควิชาคลินิกัลไมโครสโคป

ทุนการศึกษา

นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ ได้รับทุนการศึกษาประจำปี 2514 จำนวน 2 ทุน คือ--

น.ส.เอี่ยมพร ศรีสุโข นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 ได้รับทุนธนาคารแหลมทอง 1000 บาท

น.ส. พรศรี กฤษณรักษ์ นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 2 ได้รับทุนมูลนิธิสหชนาการกรุงเทพฯ จำกัด 1000 บาท

รางวัลเรียนดี

ในปีการศึกษา 2513--2514 นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ผู้ได้รับรางวัลเรียนดี มีดังนี้--

น.ส. จันจวี ศิริวิทยากร ค่าเฉลี่ยจุดลำดับชั้นตลอดปี 3.73 ได้รับรางวัลเหรียญทองแดง

น.ส. พรพรรณ ธัญญศิริ ค่าเฉลี่ยจุดลำดับชั้นตลอดปี 3.56 ได้รับรางวัลเหรียญทองแดง ซึ่งพร้อมมอบได้จัดใหม่ขึ้น ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในวันที่ 24 กันยายน พ.ศ. 2514 อันเป็นวันมหิดล.

แต่งตั้งอาจารย์พิเศษ

คำสั่งคณะแพทยศาสตร์ที่ 61/2514 วันที่ 30 กันยายน 2514 แต่งตั้งให้ข้าราชการผู้มีรายนามต่อไปนี้ เป็นอาจารย์พิเศษทำการสอนให้แก่นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ประจำปีการศึกษา 2514--2515 คือ :-

1. นายชลอ บัวน้ำจืด วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
2. นายเกรียงศักดิ์ อัมใจ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

อัตราค่าโฆษณาในระยะเวลา 1 ปี
The advertising rate per year

เต็มหน้า	600.00 บาท	Full page	600.00 bahts
ครึ่งหน้า	400.00 บาท	Half page	400.00 bahts
ปกหน้าด้านในเต็มหน้า	1200.00 บาท	Inside front cover	1200.00 bahts
ปกหลังด้านในเต็มหน้า	1000.00 บาท	Inside back cover	1000.00 bahts