วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Volume 5 January 1972 Number 1

Colony - Stimulating Factor (CSF) in Thalassemic Urine : Preliminary Report 1
Chalaw Buanamjued, B.Sc. (Med. Tech.)
Panja Kulapongs, M.D.

Delayed Leukocyte Count 9
Chantra Na Chiang Mai, B.Sc. (Med. Tech.)
Panja Kulapongs, M.D.

Strip Elution Technic for Delayed Hemoglobin Determination 13
Umparat Chumrum, B.Sc. (Med. Tech.)
Panja Kulapongs, M.D.

Coliforms in Drinking Water and Utensils of Restaurants in Chiang Mai 17
Chamroon Yasmuth, B.S.
Kampol Panas-Ampol, M.D.
Boonyong Pongphot, M.D.
Hatcha Na Bang Xang, M.D., M.P.H.
Pat Suchamnong, M.D.

Isolation of Enteric Pathogen 23
Netr Suwankrughasn, B.Sc. (Med. Tech.)
Kampol Panas-Ampol, M.D.

Serum Lipoprotein Electrophoresis 31
Pramot Wanitthanakom, B.Sc. (Med. Tech.)
Muni Keoplung, M.D.
Nantaya Waiwattana, B.Sc. (Med. Tech.)

Incidence of Rabid Dogs in Chiang Mai Province 43
Prayool Inboriboon, B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc.
Kampol Panas-Ampol, M.D.

Editorial 51
Abstract 53
News 65

18 ก.พ. 2515
หอสมุด เทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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 สุวรรณคฤหาสน์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), Cert. in Imm.

กองบรรณาธิการ

สนอง ไชยารัศมี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

สวัสดิ์ ลังกาสิทธิ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ไพโรจน์ สภาวจิตร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ประยูร อินบริบูรณ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม.

ผาสุก ชมเชิงแพทย์ M.T. (ASCP)

พัตราภรณ์ ชมเชิงแพทย์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), C (ASCP)

ประไพศรี ภูวเสถียร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม.

สุนทรี เฉลิมศรี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

เหรัญญิก

เพ็ญศรี วรรณฤมล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ผู้จัดการ

สุชาติ ศิริทูล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

ที่ปรึกษาวิชาการ

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ตะวัน กังวานพงศ์ พ.บ., D.T.M. & H. (Liverpool)

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กัมพล พนัศอำพล พ.บ.

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ประยุทธ ฐิตะสุต พ.บ., M.Sc.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์มุนี แก้วปลั่ง พ.บ.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี กันตะบุตร พ.บ., Cert. in Phyio, Biochem, and Neuro-Anatomy.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์สนาน สิมารักษ์ พ.บ., C. R. (Yale), Dip. Am. Board of Radiology.

ศาสตราจารย์ นายแพทย์บริบูรณ์ พรพิบูลย์ พ.บ., M.S.

นายแพทย์บัญจะ กุลพงษ์ พ.บ., Dip. Am. Board of Pediatrics.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์จิรศักดิ์ คำบุญเรือง พ.บ., M.Sc., Ph. D.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

EDITOR

Assistant Professor Chairojna Saeng-Udom, M.D.

ASSOCIATE EDITORS

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

BOARD OF EDITORS

Snong Chaiyarusmee, B.Sc. (Med. Tech.)

Sawat Lungarsitte, B.Sc. (Med. Tech.)

Pairojana Sapavajitr, B.Sc. (Med. Tech.)

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

Pasook Chomcherngpat, M.T. (ASCP)

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

Prapaisri Phuwasatira, B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc.

Suntaree Chalermsri, B.Sc. (Med. Tech.)

TREASURER

Pensri Vanaruemol, B.Sc. (Med. Tech.)

BUSINESS MANAGER

Suchart Siritool, B.Sc. (Med. Tech.)

BOARD OF ADVISERS

Professor Tawan Kungvanpong, M.D., D.T.M. & H. (Liverpool)

Associate Professor Kampol Panas-ampol, M.D.

Professor Prayuth Thitasut, M.D., M.Sc.

Assistant Professor Muni Keoplung, M.D.

Assistant Professor Montri Kantaputra, M.D. Cert. in Physio., Biochem., and Neuro - Anatomy.

Assistant Professor Snan Simarak, M.D., C.R. (Yale), Dip. Am. Board of Radiology.

Professor Boriboon Phornphibool, M.D., M.S.

Panja Kulapongs, M.D., Dip. Am. Board of Pediatrics.

Assistant Professor Chirasak Khamboonruang, M.D., M.Sc.. Ph. D.

NOTES ON MANUSCRIPTS

Review-type articles and case reports are accepted for publication by the Bulletin of Chiang Mai Medical Technology. All manuscripts must be original and should have preferably not been previously submitted to any other publication. Preference is given to material which is of general interest to medical practitioners and research workers in clinical medicine.

Manuscripts must be as concise as possible and should be typed in English with double line spacing. They should be forwarded to the editor, Bulletin of Chiang Mai Medical Technology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. The title should be limited to a maximum of 10 words and the article broken up with suitable subtitles. Black and white photographs may also be submitted and under special circumstances, colour may be accepted.

All accepted manuscripts are subject to copy editing, 20 reprints are returned to the author.

Manuscripts should be arranged in this form :—

An abstract of not more than 100 words containing a brief outline of the paper must accompany the manuscript.

Introduction.

Materials and Methods.

Results of Experiment.

Discussion.

References.

ใบบอกรับเป็นสมาชิก

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ที่.....

วันที่.....

ถึง บรรณาธิการ วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

ข้าพเจ้ายินดีบอกรับเป็นสมาชิก วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ ขอได้ส่งวารสารถึงข้าพเจ้า ดังนี้

นาม.....

สำนักงาน.....

บ้านเลขที่.....ถนน.....

ตำบล.....อำเภอ... .....

จังหวัด.....

ข้าพเจ้าได้ส่งค่าบำรุงเป็นเงิน ๒๐.๐๐ บาท มาพร้อมแบบฟอร์มนี้แล้ว

ลงชื่อ.....

ค่าบำรุงสมาชิกปีละ ๒๐ บาท ตลอดชีพ ๒๐๐.๐๐ บาท

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

COLONY-STIMULATING FACTOR (CSF) IN THALASSEMIC URINES : PRELIMINARY REPORT.

By

Chalaw Buanamjued, B.Sc. (Med. Tech.) *

Panja Kulapongs, M.D. **

ABSTRACT

The modified method for an in vitro culture of bone marrow cells is described. The colony stimulating factor (CSF) activity in urines of normal and diseased children were detected. Thalassemic urines possess higher CSF activity than normal but still lower than leukemic urines.

INTRODUCTION.

Recently, the methods of hematopoietic cell culture in vitro with which colonies of maturing granulocytes can be grown single cells had been described (1, 2,3,4). In the presence of the stimulating factor colonies of granulocytic and mononuclear cells can be grown from the marrow and speen of animals (1,2), and from human bone marrow (4, 5). Substances which stimulate murine or human marrow growth include various cell feeder layer, urine, serum and conditioned media prepared from tissues (8,9,10). Metcalf and associates (2, 11). noted that bone marrow cells are able to proliferate in agar cultures and form colonies of granulocytes and/or macrophages if stimulated by the colony-stimulating factor (CSF). This factor is found in the serum and urine of normal mice and humans. There is evidence indicates that CSF function in vivo as humoral regulator of granulopoiesis and monocyte formation (7, 12, 13). The excretion of CSF into the urine appears to be a major metabolic fate of this substance. It was noted that serum CSF levels are elevated in both the conventional and germ-free mice with leukemia (14, 15, 16). It was also found that CSF level in

* *Instructor, Section of Clinical Microscopy, School of Medical Technology, Faculty of Medicine.*

** *Hematologist, Dept. of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.*

sera and urine from patients with various types of leukemia were higher than normal (7, 17).

Thalassemia is basically the inborn error of globin polypeptide chain synthesis which affect solely the erythropoietic cells of the marrow. Leukocytosis and granulocytosis are the common findings in these patients but the CSF activity in thalassemic urines has never been reported.

MATERIALS AND METHODS.

I. Collection and preparation of material.

a. Urine CSF (modified from Robinson et al) (6). Urine samples from normal individuals and patients were collected in sterile bottles. Fifty ml. portion of each sample were dialyzed in Visking dialysis tubing (wall thickness 0.001 inch) against 3 daily changes of 1,000 ml. of distilled water at 4° C for 72 hours. Twenty ml. of the dialyzed urine were then centrifuged at 9,000 r.p.m. for 15 minutes. The supernatant fluid was millipore-filtered (with 0.45 micron millipore membrane) then either used immediately or stored at-20° C. until used.

b. Pooled human sera. Sterile pooled sera obtained from the Hospital blood bank.

c. Sterile 6% dextran solution. (Cutter Lab., Berkeley, Cal., USA.). Keep the solution at-4° C.

d. Sterile Hank's solution. Prepared Hank's solution (BBL, Division of Bio Quest, Cockeysville, Md., USA.) pH 7.2 then sterilized by millipore-filtered technic. Keep in the refrigerator.

e. Culture media. The agar media were prepared by dissolving 1.5 gm. of Bacto-Agar (Difco) in 36 ml. of distilled water, boiled and autoclaved for 15 minutes. Bring the temperature of the agar solution to 50° C. (by using 50° C waterbath) then added 4 ml. of Hank's solution, 6 ml. of dialyzed urine and 4 ml. of pooled sera, mixed. Twenty ml. aliquot of the culture media were pipetted into a sterile 35 × 10 mm. plastic Petri dish (Falcon). These culture plates were used immediately or stored at 4° C.

f. Bone marrow cells suspension. Approximately 2-3 ml. of human bone marrow were collected into the sterile heparinized plastic syringe. One-quarter to one-half volume of 6% dextran was added directly into the bone marrow syringe, mixed well, then the syringe was placed end-up in the refrigerator for 60 minutes. The supernatant fluid containing marrow cells was then transfered (either by the pasteur pipette or by squeezing the fluid through the bented needle) into a sterile plastic tube containing equal volume of Hank's solution. After centrifuged at 4° C., 800 - 1,000 r. p. m. for 5 minutes the supernatant fluid was discarded. The sedimented marrow cells were resuspended in Hank's solution and cell count done.

II. Bone marrow culture assays.

Approximately 5×10^5 nucleated marrow cells were transfered on to the culture plate to make a thin fluid film convering the media surface. The cell cultures were then incubated in a humidified candle jar placed in an incubator at 37° C. The culture plates were examined daily for the appearance and sizes of colonies. Colony counts were performed at ×25 magnification using a dissecting microscope with direct lighting. All tests were done in triplicate.

RESULTS.

All cell colonies appeared on day 6-7 but were small and difficult to count. The accurate estimation of colony numbers was possible after 10 days. Colony size was fairly uniform in any given culture. It is interesting that :

1. No colony growth observed from bone marrow cells of aplastic anemia and chornic myelogenous leukemia when normal or thalassemic urine were added.

2. There is no difference in colony formation ability of thalassemia patient and normal individuals.

3. Thalassemic urines possess highter CSF activity than normal reflected by the higher colony counts when they were used instead of normal urine.

4. Leukemic urine has the strongest CSF activity. This is in agreement with previous reports.

TABLE I : EFFECT OF CSF IN DIFFERENT TYPES OF URINE

Subjects	Colony counts (per 5×10^5 marrow cells)		
	Normal urine	Thalassemic urine	Leukemic urine
Normal	26	–	–
Normal	25	56	61
Normal	28	23	57
Thalassemia	34	44	43
Thalassemia	13	19	30
Aplastic anemia	–	–	4
CML.	–	–	7

DISCUSSION.

Colony - stimulating factor (CSF) is a serum glycoprotein of molecular weight approximately 45,000 (18, 19). which is excreted in the urine and has the specific activity to stimulate in vitro the proliferation of granulocytes and macrophages. Detection of CSF activity in serum is often masked by the presence of lipoprotein inhibitors which block the in vitro action of CSF. These inhibitors can be precipitated by dialysis of the serum. Normal human sera possess uniformly high inhibitor levels. Previous studies of sera and urines from patients with various types of leukemia indicated that CSF levels were higher than normal in some patients and subsequent studies on urines from such patients have shown fluctuations in CSF putout during the course of the disease. (7, 17). Most recently. Metcalf and associate (23) note the abnormally large amount of CSF were present in about half of the urine specimens from patients with acute leukemia.

Our study indicated that urines of thalassemic patients possess higher CSF activity than normal urine. But caution is needed in interpreting its significance since it is noted that higher urine excretion of CSF does not necessarily a reliable index of serum CSF levels. (23) However, since clearance in the urine is a major metabolic fate of CSF (24) the higher output of CSF in urine does suggest a higher overall level of CSF production in our thalassemic patients.

Results from animal studies indicated that cells capable of repopulating the entire hematopoietic system can be found circulating in the blood stream. It has been debated whether such cells circulate in human until Chervenick and Boggs, (27) and Kurnick and Robinson (28) demonstrated that circulating leukocytes also capable of giving rise to such colonies but are considerably less than those from marrow cells. The morphology of colony cells from blood and bone marrow cells is similar. All colonies appear to begin as large mononuclear cells (5-10 days) with a gradual progression to cells with the morphology of mature granulocytes (20-25 days). Subsequently, many larger phagocytes appeared in the colonies. (3, 4) Colony formation was observed after 6-10 days of incubation and increased to a maximum size of 200 - 1,000 cells after 18 - 20 days and then began to undergo destruction. Colony size was fairly uniform in any given culture. The rate of growth observed is considerably slower than colonies arising from mouse bone marrow where initial growth can be observed within 24 to 48 hrs. and maximum growth is observed by 10-12 days.

It is interesting to note that in the in vivo colony assay system in the mouse,

colonies of erythrocytic, megakaryocytic and granulocytic cells appear on the spleen of mice following irradiation, (29,30) while in vitro system only granulocytes and macrophages have been observed. This suggests that the in vitro colonies from a more differentiated stem cell than that giving rise to in vivo colonies. (31) Whether cell colonies arise from a single stem cell or from several is not entirely clear at the moment.

CONCLUSION

Urine from thalassemia patients contain higher colony-stimulating factor (CSF) activity than normal urine. This is probably reflecting the higher CSF activity in their sera and may be partly responsible for granulocytosis observed in these patients.

REFERENCES

1. Pluznik, D.H., and Sachs, L.: The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. J. Cell. Comp. Physiol. 66: 319, 1965.
2. Bradley, T.R., and Metcalf, D.: The growth of mouse bone marrow cells in virro. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44: 287, 1966.
3. Robinson, W.A., and Pike, B.L.: Colony growth of human bone marrow cells in vitro. In Stohlman, F., Jr. (Ed.): Hematopoietic Cellular Differentiation. New York, Grune & Stratton, 1970.
4. Pike, B.L., and Robinson, W.A., : Human bone marrow colony growth in agar gel. J. Cell. Physiol. 76:77, 1970.
5. Senn, J.S., Mc Culloch, E.A., and Till, J.E. : Comparison of colony forming ability of normal and leukaemic human marrow in cell culture. Lancet 2:597, 1967.
6. Robinson, W.A., Stanley, E.R., and Metcalf, D.: Stimulation of bone marrow colony growth in vitro by human urine. Blood 33:396, 1969.
7. Foster, R., Jr., Metcalf, D., Robinson, W.A., and Bradley, T.R.: Bone marrow colony stimulating in human sera. Brit. J. Haemat. 15:147, 1968.
8. Pluznik, D.H., and Sachs, L.: The induction of clones of normal mast cell by a substance from conditioned media. Exp. Cell. Res. 43:553, 1966.
9. Worton, R.G., Mc Culloch, E.A., and Till, J.E.: Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. J. Cell. Physiol. 74: 171, 1969.
10. Chervenick, P.A., and Boggs, D.R.: Bone marrow colonies: Stimulation in vitro by supernatant from incubated human blood cells. Science 169:691,1970.

11. Metcalf, D., Bradley, T.R., and Robinson, W. : Analysis of colonies developing in vitro from mouse bone marrow cells stimulated by kidney feeder layers of leukemic serum. J. Cell. Physiol. 69: 93, 1967.

12. Metcalf, D., and Stanley, E.R. : Quantitative studies on the stimulation of mouse bone marrow colony growth in vitro by normal human urine. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47:453, 1969.

13. Bradley, T.R., Metcalf, D., Sumner, M., and Stanley, R. : Characteristics tissues. In Farnes : P. (Ed.) : In Vitro 4. Baltimore, William & Wilkins, 1969, p. 22.

14. Robinson, W., Metcalf, D., and Bradley, T. R. : Stimulation by normal and leukaemic mouse sera of colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. J. Cell. Physiol. 69:83, 1967.

15. Metcalf, D., and Foster, R. : Bone marrow colony stimulating activity of serum from mice with viral-induced leukemia. J. Nat. cancer Inst. 39:1235, 1967.

16. Metcalf, D., Foster, R., and Pollard, M. : Colony stimulating activity of serum from germfree normal and leukemia mice. J. Cell. Physiol. 70:131,1967.

17. Robinson, W.A., and Pike, B.L. : Leukopoietic activity in human urine. The granulocytic leukemias. New Eng. J. Med. 282:1291, 1970.

18. Stanley, E.R., and Metcalf, D. : Partial purification and some properties of the factor in normal and leukaemic human urine stimulating bone marrow colony growth in vitro. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 47:467, 1969.

19. Stanley, E.R., and Metcalf. D. : The molecular weight of colony stimulating factor (CSF). Proc. Soc. Exp. Biol. Med.

20. Stanley, E.R., Robinson, W.A., and Ada, G.L. : Properties of the colony stimulating factor in leukaemic and normal mouse serum. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46:715, 1968.

21. Chan, S.H., and Metcalf, D. : Inhibition of bone marrow colony formation by normal and leukaemic human serum. Nature (London) 227:845, 1970.

22. Chan, S.H., Metcalf, D., and Stanley, E. R. : Stimulation and inhibition by normal human serum of colony formation in vitro by bone marrow cells. Brit. J. Haemat. 20:329, 1971,

23. Metcalf, D., et al : Colony-stimulating factor and inhibitor levels in acute granulocytic leukemia. Blood 38 : 143, 1971.

24. Chan, S.H. : Studies on colony stimulating factor (CSF). Role of the kidney in clearing serum CSF. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134:733, 1970.

25. Jacobson, L. O., Mark, E. K., Gaston, E.D., Robson, M.J., and Zirkle, R.E. : The role of the spleen in radiation injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70 : 740, 1949.

26. Goodman, J. W., and Hodgson, G. S. : Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. Blood 19 : 702, 1962.

27. Chervenick, P. A., and Boggs, D. R. : In vitro growth of granulocytic and mononuclear cell colonies from blood of normal individauls. Blood 37 : 131, 1971.

28. Kurnick, J. E., and Robinson, W. A. : Colony growth of human peripheral white blood cells in vitro. Blood 37 : 136, 1971.

29. Till, J. E., and Mc Culloch, E. A. : A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells Rad. Res. 14:213, 1961.

30. Lewis, J.P., and Trobaugh, F. E., Jr. : Haematopoietic stem cells. Nature (London) 204:589, 1964.

31. Bennett, M., Cudkowicz, G., Foster, R.S., Jr., and Metcalf, D. : Hemopoietic progenitor cells of anemic mice studied in vivo and in vitro. J. Cell. Physiol. 71 : 211, 1968.

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

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

DELAYED LEUKOCYTE COUNT.

By

Chantra Na Chiang Mai, B.Sc. (Med. Tech.) *

Panja Kulapongs, M.D. **

ABSTRACT

A simple method for preservation of white blood cells for delayed counting at leisure up to 100 or more days is described. It's simplicity, reproducibility with certain degree of accuracy make it useful for field survey.

INTRODUCTION

Shaper and Lewis noted that with only slight modification of the standard method leukocytes can be preserved for a long period of time so that the total leukocyte count could be performed at convenient away from the area of blood collection. We have been using this technic in the field work in which the total leukocyte counts were done weeks afterward.

METHOD.

The procedure for total white cell counts were done according to the standard method. (2) The diluting fuid is made of 4% acetic and is colored pale violet with gentian violet. A 1 in 20 dilution of tested blood samples (obtained from 22 individuals) is made by adding 1 ml. of venous blood into 19 ml. of diluting fluid in a plastic container, mix well and tightly stoppered. Ten specimens were kept at room temperature of 25 - 28° C. and the rest were kept in refrigerator at 4° C. Total white blood cell count of these specimens were determined at regular intervals.

RESULTS.

The results obtained (see table) is summarized as follow :

1. While being kept at 4° C. the total white cell counts of the specimens decreased significantly up to 40 - 50% of the initial counts within 30 days then remained constant up to 260 days.

* Supervisor, Section of Clinical Microscopy, School of Medical Technology, Faculty of Medicine.

** Hematologist, Dept. of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

2. At room temperature the total white cell counts were fluctuating but closed to the initial counts up to the initial counts up to 100 days or longer. Significantly lowered count encountered only after 150 days of storage. This is in agreement with previous experience. (1)

COMMENTS.

The method used is obviously not for routine use in clinical laboratory but useful for workers engaged in the field study rather.

CONCLUSION.

The simple method for preservation of white blood cells for delayed counting at the convenient time is described. It is recommended for field study.

REFERENCES.

1. Shaper, A.G., and Lewis, P. : Preservation of leucocytes for delayed counts. Lancet 1 : 105, 1969.
2. Cartwright, G.E. : Diagnostic Laboratory Hematology. Fourth Edition, Grune & Stratton, New York, 1968.

TOTAL LEUKOCYTE COUNTS AT VARYING PERIOD

Specimen No.	Day															
	1	10	20	30	50	100	150	200	230	260	290	320	340	360	380	400
1	12500	11500	10550	11600	11000	10500	11300	9250	10300	7350	10150	8900	9400	9250	8700	8600
2	7200	6750	7050	8800	7800	6500	7100	6450	6600	6700	5650	5850	5150	5600	5500	5350
3	6800	7500	7200	7900	7650	7050	5450	5200	5250	5250	6650	6000	4600	5000	4800	4900
4	10200	8600	9650	8950	8750	9600	9500	6900	6850	5350	6050	6000	5100	5300	4600	4850
5	9350	9550	9400	9900	9300	8900	9500	9300	9000	7500	7000	7250	7350	7100	6850	7000
6	8050	9250	8800	8450	8250	9200	8550	8450	7700	8100	8400	8000	8250	7700	7850	7400
7	4100	4300	4350	4200	4450	4600	3700	3350	3650	3550	3050	4250	3300	3450	3100	3300
8	13650	14500	13700	16100	15000	12500	12700	12550	14850	11250	12300	11500	13000	12000	12650	12200
9	11300	12900	12500	12950	11600	10950	11850	6350	7850	5000		2050	2200	1750	1600	1250
10	3050	3650	3450	3250	3100	3050	3350	3200	3250	2550	2800	2400	2900	2850	2500	2650
11	6250	5440	4150	5600	5500	3500	2850	3100	2700	2900						
12	13850	8600	7750	8500	8100	8850	8450	8500	8650	8400						
13	7200	6400	6200	5700	6000	6200	5850	5500	5650	5350						
14	3750	3400	3050	3200	3800	3150	3100	3350	3100	3400						
15	4500	3400	3900	3200	3400	3400	3350	3300	3150	2900						
16	10350	7700	6850	5750	6100	5300	5450	5150	5250	4850						
17	4450	3250	4850	3850	4600	4650	4250	4000	4150	4200						
18	9900	8400	5250	5850	3700	3850	3900	3550	3650	3400						
19	10150	9750	8400	8800	8050	7400	7900	7250	7300	6450						
20	2250	2300	3250	2700	2550	2600	2800	2450	2400	1900						
21	9750	7150	8750	7850	8100	7500	6500	6800	6400	5750						
22	10100	9800	9100	8250	9950	8100	6900	7850	7950	7250						

NOTE. - Specimens number 1 to 10 were kept in room temperature (25-28° C).
- Specimens number 11 to 22 were kept in a refrigerator (4° C).

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

STRIP ELUTION TECHNIC FOR DELAYED HEMOGLOBIN DETERMINATION

By

Umparat Chumrum, B.Sc. (Med. Tech.) *

Panja Kulapongs, M.D. **

ABSTRACT.

A simple method of delayed hemoglobin determination utilizing filter paper strip elution technic is described. Twenty microliter of blood sample is transferred from Sahli hemoglobin pipette on to the filter paper strip. The latter is subsequently immersed in 5 ml. of Drabkin's solution for 30 minutes and the hemoglobin content of the solution is measured spectophotometrically. The blood sample is stable up to 5 weeks or longer period of storage. It has proved its feasibility and usefulness for field work.

INTRODUCTION.

In addition to the need for a rapid and accurate method of clinical hemoglobinometry, there may occasionally be a requirement for a convenient mean for delayed determination of hemoglobin. The latter would be useful in certain field investigations, epidemiological surveys, as well as when one wish to store a patien's blood for a later determination in a clinical laboratory.

We are reporting our experience with the simple, filter paper strip elution technic for delayed hemoglobin determination and its usefulness in the field work.

MATERIALS AND METHOD.

A volume of 20 cu. mm. blood was taken up into a Sahli hemoglobin pipette then carefully transferred on to one end of a filter paper strip (Whatman No. 1 or 2, 12×60 mm. size). It was allowed

* Instructor, Section of Clinical Microscopy, School of Medical Technology Faculty of Medicine.

** Hematologist, Dept. of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

to dry in room temperature for about 30 minutes then was kept in the plastic bag or container. Later, this filter paper strip was placed in the test tube containing 5 ml. of Drabkin's solution. The hemoglobin content of the solution was measured by a standard spectrophotometric technic.

RESULTS.

I. Elution time of blood from the filter paper. The filter paper strips with blood samples were placed in separate test tubes with Drabkin's solution. The hemoglobin content of the solution were estimated at varying intervals. The results obtained (see Figure) indicated that complete elution of blood occurred at 30 minutes. Frequent shaking of the strips or the test tubes enhances the elution rate but the excessive shaking may cause the undesirable turbidity of the solution. This is the result of the dissolution of the filter paper strip and requires adequate centrifugation before the hemoglobin content is estimated. Adequate elution of the blood sample is also obtained when the filter paper strip was left in the Drabkin's solution for 30 minutes without shaking.

II. Effect of storage condition. Filter paper strips with blood samples were kept in the closed container (with minimal exposure to bright light) at varying periods of time up to 26 days in either the freezer (-20° C.), ice box (0 to 4°C.), room temperature (25-28° C) and in the car (10-45° C). Each blood sample was eluted for 30 minutes is Drabkin's solution before the hemoglobin content was measured. The results obtained indicated that:

a. The hemoglobin values obtained from blood samples kept in different temperature and condition were identical.

b. The hemoglobin values remained constant during the 36 days of storage.

The most interesting result observed is the stability of hemoglobin values throughout the test period of 36 days. It may be stable as long as 6 mounths or longer when it is kept away from light.

III. Stability of blood from the patients with different type of anemia. blood samples obtained from patients with Thalassemias, leukemias, Aplastic anemias, G-6-PD deficiency etc. had shown the stability similar to normal blood.

COMMENTS.

The elution of hemoglobin from the filter paper strip is completed at 30 minutes similar to previous experience. (1) It is recommended that the elution required only minimal shaking. Centrifugation is needed only to eliminate the turbidity resulting from an excessive agitation. Searcy et al (2) stated that the hemoglobin value decreases 1.0 to 1.5 gm./100 ml. after several weeks of storage. Sundharagiati (1) cautioned that the hemoglobin value decreases gradually after 10 days of storage.

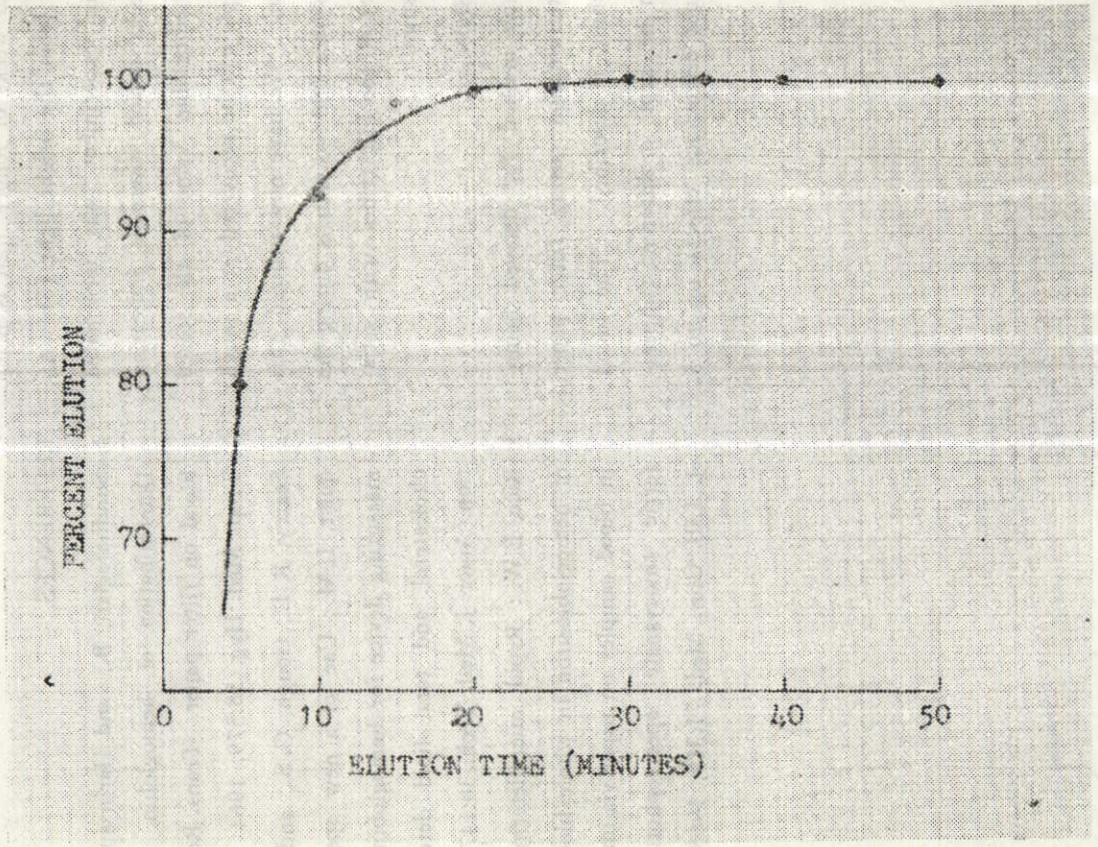
Our results are in variance with previous reports and indicated that the hemoglobin value of blood sample is constant for a period of 5 weeks or longer if it is being kept away from the bright light. (3) Although our experiment was terminated after 5 weeks period, there is indication that the hemoglobin value of the stored blood sample can be recovered at a much longer time. We have now utilized this technic on over 600 individuals during the field survey of the hill tribes with satisfactory results.

CONCLUSION.

A simple method for delayed hemoglobin determination using filter paper elution technic is described. The blood sample can be kept at different temperatures without deleterious effects up to 5 weeks providing that it is kept away from the bright light, It is useful especially for field survey purpose.

REFERENCES.

1. Sundharagiati, B., and Harinasuta, C. : Determination of hemoglobin in dry blood on filter paper. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 58:579, 1964.
2. Searcy, R.L., Gough, G.S., and Bergquist, L.M. : Use of a new specimen-measuring device for hemoglobin, total cholesterol, and total lipid determination. Amer. J. Med. Tech. 30:147, 1964.
3. Rice, E.W. : Rapid microdetermination of hemoglobin-iron in whole blood and in blood samples on paper via improved ferric thiocyanate spectrophotometry. J. Lab. Clin. Med. 71:319, 1968.


PERCENT ELUTION
100
90
80
70
0
10
20
30
40
50
ELUTION TIME (MINUTES)

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

Coliforms in Drinking Water and Utensils of Restaurants in Chiang Mai

Chamroon Yasmuth, B.S. *
Kampol Panas-Ampol, M.D. **
Boonyong Pongphot, M.D. *
Hatcha Na BangXang, M.D., M.P.H. *
Pat Suchamnong, M A. *

Abstract

A restaurant inspection in Municipal area in Chiang Mai Province during January 1967 - January 1968 revealed a high contamination. Specimens were drinking water and utensils; samples from 100 restaurants were collected by cluster random sampling methods. Thirty-two percent of drinking water samples and thirty-six percent of the utensils were found positive for coliform bacteria.

Actually, foods and water are necessary for the maintainance of health and life of human being. The ingestion of the contaminated foods and water may cause a serious illness especially the gastrointestinal diseases, such as cholera, enteric fever, amoebic and bacillary dysenteries and other diseases that represent the gastrointestinal symptoms. Many patients are killed by those diseases yearly and the socio-economic problems are no doubt occurred. Because of Thailand is a developing country, most of the poeple are working outdoor and usually have lunches or even breakfasts and dinners in the middle or low-class restaurants. Therefore, the unqualified restaurants or food-shops including careless cooks, waiter or waitress who may be carrier will be the source of transmission of diseases to the customers.

The purpose of this study is to search for the incidence of coliform bccilli in the restaurants and food-shops in Chaing Mai Province. The incidence observed would

* *Department of Preventive and Social Medicin, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.*

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

be an indicator to tell us how dirty the restaurants or food-shops are, because the coliform bacilli contaminated in water and on utensils for food services undoubtedly are from the intestinal excreta which may not only exhibit the normal flora but also the other important pathogens. Besides, the findings of this study may be beneficial and good information for the Municipal Health Department and others concerned to improve the standard of the restaurants and food-shops for better care of health of the people.

Meterials and Methods :

Various types of restaurants and food-shops in Nakorn Chiang Mai Municipal area are 450 in number (4). They are real typed restaurants, Thai food restaurants, Chinese Food restaurants, Chinese noodle food-shops, boiled chicken with oily rice food-shops and the native Northern Thai food-shops. About sixteen random samples of restaurants and food-shop were selected from each of six municipal areas and made the total of one hundred samples.

Two types of specimens were collected from the water and utensiles. For the water kept in bottles or other containers was delivered into the sterile containers. For the utensils (basins, jars, spoon, folks and chopsticks, if any), by the sterile tecnique, the sterile swabs were applied on each of those mentioned utensils and then transfered into the lactose broth media.

The bacteriological studies included the total bacterial count and the identification of coliform bacteria. The latter was the quantitavive and qualitative measures. The quantitative measure (total plate count) was to indicate the number of non-specified bacteria present in one millimeter of water samples. The qualitative study was to identify the coliform bacteria by presumptive, confirmatory, and complete tests respectively.

The criterias for grading of the restaurants and food-shops were as follows :

1) Grade A : This grade was characterized by concreted buildings, nice rest rooms and washing places with good lights and ventilation. The food keeping places showed a good design to prevent the contamination from transmitters.

2) Grade B : This type of restaurants was made of wood except the concreted floor. The rest rooms, washing areas and food keeping places were in good condition with good lights and ventilation. The general cleanliness was in moderate.

3) **Grade C :** They were wooden buildings and the concreted floor, if any, it was in bad condition. There were rest rooms but without the definite places for washing purpose. The light, the ventilation and general cleanliness were in moderate.

4) **Grade D :** This type of food-shops were situated aside the house or under the

trees. The general cleanliness was quite poor.

Results :

Table I indicates the incidence of coliform bacilli in drinking water and food serving utensils. In drinking water showed 32 per cent of incidence of coliform bacilli. The **E. coli** was found in 12 restaurants so the percentage of incidence was 12. The **A. aerogenes** was found to be 20 per cent. The enterococci was also identified and was 32 per cent. The specimens obtained from utensils showed 36 per cent of coliform bacilli which represent 20 per cent E. coli, 16 per cent **A. aerogenes** and 40 per cent enterococci.

Table II illustrates the M.P.N. value and total plate count present in drinking water 100 graded restaurants as specified. There were 7 grade A, 31 grade B, 59 grade C and 3 grade D. The average M. P. N. of drinking water found in grade A, B, C and D was 402, 1105, 1237 and 1247 respectively. The total plate count was 1,773,667 in grade A, 2,739,595 in grade B, 5,902,683 in grade C and 6,698,000 in grade D.

Table III exhibits the incidence of the coliform bacteria isolated from drinking water and utensils of graded restaurants as follows :

1) **Grade A restaurants :** The total examined was 7. In drinking water showed none of **E. coli**, 28.5 per cent **A. aerogenes** and 42.8 per cent enterococci. There were 28.5 per cent of **E. coli**, 42.8 per cent of **A. aerogenes** and 28.5 per cent of enterococci identified from the food plates.

2) **Grade B restaurants :** There were 31 restaurants examined. The drinking water exhibited 6.5 pee cent **E. coli**, 27.5 per cent **A. aerogenes** and 29.1 per cent enterococci. The specimens obtained from the food plate showed 19.4 per cent **E. coli**, 9.6 per cent **A. aerogenes** and 38.7 per cent enterococci.

3) **Grade C restaurants :** From the total of 59 restaurants examined, the incidence of 13.6 per cent **E. coli**, 13.4 per cent **A. aerogenes** and 35.6 per cent enterococci were observed in drinking water. The incidence of bacteria on the food plates represented 16.9 per cent **E. coli**, 16.2 per cent **A. aerogenes** and 44.1 per cent enterococci.

4) **Grade D restaurants :** There were only 3 restaurants examined. There were 33.3 per cent **E. coli**, and none of the **A. aerogenes** and enterococci shown in drinking water. The food plates showed 66.7 per cent **E. coli** and 33.3 per cent **A. aerogenes.**

Discussion :

In considering the laboratory results of bacteriological studies of drinking water and utensils obtained from 100 restaurants in Chiang Mai Municipal area as shown from above, most of the restaurants seem

to be rather poor hygienic care and under standardization. Because, firstly, the total plate count was over one hundred million per ml in average in either grade A or grade D restaurants; secondly, the range of M.P.N. value was 402-1,142 which was very much far from the standard of drinking water (M.P.N. 2.2) (3).

Identification of coliform bacteria from drinking water in Table I showed 32 per cent (12 per cent **E. coli**, 20 per cent **A. aerogenes** and 32 per cent enterococci) that represented in all grade restaurants. The authors would say that the tea-like drinking water is prepared from the tap or well water without boiling. In addition, the containers containing drinking water may be contaminated also. In contrast, some restaurants serve tea prepared by boiling water and the coliform bacilli are much less observed.

One hundred samples taken from utensils represented 36 per cent of coliform bacteria composed of 29 per cent **E. coli**, 16 per cent **A. aerogenes** and 40 per cent enterococci. This incidence is identical with that of the observed drinking water Why? It is recognized that the washing water used to clean the utensils are taken from the well nearby the lavatory. So, undoubtedly, the water is contaminated with the intestinal flora. In addition, the washed bowls or plates are dried with dirty cloths which are used also for other purposes, for example, for cleaning the cutting plates, knifes and cooking counter. As we know, Chiang Mai is one of the most attractive and interesting city, especially during Songkarn (Native New Year) and Loi Kratong Festival, for visitors and tourists who must need foods and drinks during the stay. If the restaurants are in poor hygiene and careless in preparing foods to serve the people, it may say that those restaurants are the reservoir for spreading of the diseases.

In conclusion, most of the restaurants Chiang Mai are much under the standardization for health care. They seem to be harm to the publics. For the improvement and taking care the people, ones who concern must take more interest to the food-shops and restaurants by interval inspection together with recommendation and the laboratory control must be introduced and might be a good source of information. It is worthwhile to note that this study is limitted to only the condition of drinking water and utensils used to prepare and serve foods. There are many other factors, the cooks, the waiters and the environments also involved in this problem. The factors mentioned here are also needed to solve.

Acknowledgement :

The authors would like to express many thanks to Dr. (Mrs.) Sri Srisukri,

M.D., the former director, Department of Nakorn Chiang Mai Municipal Health; Dr. Parimon Khanjanasthiti, Ph. D., Mr. Netr Suwankrughasn, B.Sc. (Med. Tech.), Department of Microbiology; Mr. Boonratana Manowong, Department of Parasitology; Mr. Pichai Supthayaporn, M.P.H., Department of Preventive and Social Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University and all personels of Nakorn Chiang Mai Municipal Health in assisting and supervising this paper.

Table I: Incidence of Coliform Bacteria identified from the drinking water and utensils in restaurants

ORGANISMS.	TOTAL NUMBER-100 SAMPLES.			
	Drinking Water		Utensils	
	No. Positive	%	No. Positive	%
Escherichia coli	12	12	20	20
Aerobacter	20	20	16	16
Enterococci	32	32	40	40
Total	64	64	76	76

Table II: Incidence of Coliform bacteria in drinking water in graded restaurants.

Grads of Restaurant	No. of samples examined	Total Plate count (average)	M.P.N. Average	Organisms					
				Escherichia	%	Aerobactor	%	Enterococci	%
Grade A	7	1,773,667	402	0	0	2	28.5	3	44.5
Grade B	31	2,739,595	1,105	2	6.5	8	25.5	9	29.1
Grade C	59	5,902,683	1,237	9	13.6	8	13.4	21	35.6
Grade D	3	6,689,000	1,247	1	33.3	–	–	–	–

Table III : Comparative study of Coliform bacteria idenfified from drinking water and utensils in graded restaurants.

Grades of restaurant	No. of samples examined	Drinking water						Utensils					
		Escherichia		Aerobacter		Enterococci		Escherichia		Aerobacter		Enteroc	
		Positive	%	Positive	%	Positive	%	Positive	%	Positive	%	Positive	
Grade A	7	0	0	2	28.5	3	42.8	2	28.5	3	42.8	2	28
Grade B	31	2	6.5	8	27.5	9	29.1	6	19.4	3	9.6	12	38
Grade C	59	9	13.6	8	13.4	21	35.6	10	16.9	9	16.2	26	44
Grade D	3	1	3.33	–	–	–	–	2	66.7	1	33.3	–	
Total number	100	12	12.0	18	18.0	33	33.0	20	20.0	16.0	16.0	40	[illegible]

REFERENCES

1. Ehlers and Steel : Municipal and Rural Sanitation, 5th Ed. Mc Graw-Hill, 1958, p. 80.
2. American Public Association : Standard Method for the Examination of Water and Waste Water, 11 th Ed. 1960, p. 492 - 509.
3. World Health Organization : International Standard for Drinking - Water, 1958, p. 15-51.
4. Statistical numbers of Restaurants and Food - Shops in Nakorn Ghiang Mai Municipal area registered and approved by Nakorn Chiang Mai Municipal Health Department.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

ISOLATION OF ENTERIC PATHOGENS *

"Comparison of different enrichment and plating media for recovery of medically important bacteria from human stool specimens"

Netr Suwankrughasn, B.Sc. (Med. Tech.) **
Kampol Panas-Ampol, M.D. **

ABSTRACT

To isolate enteropathogenic bacilli from patients' stool, One gram samples of fecal specimens were homogenized using glass bead, and swabs were saturated from this suspension and used to inoculate the various agar media and different enrichment broth media. After over night incubation Mc. and SS. agar were inoculated from the enrichment broth media.

Over a one year period, stool cultures of clinical diarrhoea cases yielded 16 strains of Salmonella typhi, 2 Shigella dysenteriae, 12 Shigella flexneri, 4 Shigella sonnei, and 11 Proteus morganii. No media proved specific for isolation of pathogenic bacteria.

It was the purpose of this investigation to study isolation of enteropathogenic bacilli causing diarrhoea in patients, comparing different enrichment and plating media, and determining susceptibility of enteric bacilli to antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

To isolate enteropathogenic bacilli (Salmonella, Shigella, Pathogenic E. coli, V. cholera, and Arizona,) from Patients' one gram samples of fecal specimens were homogenized using glass beads, and swabs were saturated from this suspension and used to inoculate the various media (Mac Conkey agar (Mc), Eosin methylene blue agar (EMB), Xylose lysine medium(XLM), Salmonella and Shigella agar (SS), Brilliant green agar (BG), and Bismuth sulfite agar

* This project was supported by National Research Council.

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

*** Am. J. Med. 39 : 766-769, 1965.

(BS) and different enrichment media (Heart infusion broht (HIB), Gram negative broth (GNB), Selenite broth (BS), and Tetrathionate broth (TB). After overnight incubation Mc. and SS. agar were inoculated from the enrichment media.

Identification of enteropathogenic bacilli was by appropriate biochemical tests and serological identification. Susceptibility of enteropathogenic bacilli to antibiotics (Chloramphenicol, Erythomycin, Streptomycin, Kanamycin, and Tetracycline) was determined on the pure culture isolates, using a standardized diffusion technique.

Known cultures (Salmonella species, Shigella species, pathogenic **E. coli Proteus morganii**, and **Vibrio cholera** species) were studies by culturing in Heart infusion broth at 37°C overnight, and then diluting the culture with HIB. to 1 : 1000, (0.05 ml broth culture diluted to 50 ml with HIB). A swab was used to inoculate each diluted culture onto Mc., XLM., EMB., SS., BG., and BS.,. Four swabs immersed into the same dilute culture were then put into tubes of HIB., GNB., SB., and TB. plates and tubes were incubated at 37°C overnight. plats were then examined and enrichment broth cultures subcultured to Mc. and SS., which were then examined after 37°C overnight incubation.

Known mixed cultures were studied by using two diluted cultures (1 : 1000) mixed together in the ratio 1 : 1. Diluted mixed cultures were inoculated onto the plates and in broth uaing the same method as in the known cultures study.

RESULTS

Salmonella species isolated from clinical specimens included three **Salmonella typhi** (S) from stools, three **Salmonella typhi** (B) from blood, one **Salmonella typhi** (U) from urine and **Salmonella para** C_1. All Salmonella species grew well on the plates except BS., on which some strains were inhibited; in broth cultures, all of the organisms grew well (table I.).

Of Shigella species cultivated on Mc., EMB., XLM., SS., BG., and BS., agar plates, most were inhibited on SS. and BS. agar plates. Some Shigella species were inhibited in SB. (table II)

Escherichia coli 0119 : B 14 grew on Mc., EMB., XLM., BG., BS., but it was inhibited on SS. agar. In HIB., GN., SB., TB. cultures, it grew well. **Proteus Morganii** grew on Mc., EMB., SS., BG., but did not grew on BS. agar. In all broth cultures, it grew well (table III).

11 **Vibrio cholera Eltor** (Inaba phage type 8) were slightly inhibited on EMB., SS. and completely inhibited on BS. agar. All grew well in HIB., GN., SB. and TB. (table IV)

Of the cultures of pathogenic Bacilli mixed (1:1) with **E. coli** from human stools, some were overgrown by **E. coli.**

(pathogenic bacilli could not be isolated) (table V)

Over a one year period, stool cultures of clinical diarrhoea cases yielded 16 strains of **Salmonella typhi**, 2 **Shigella dysenteriae**, 12 **Shigella flexneri**, 4 **Shigella sonnei** and 11 **Proteus morganii.** No media proved specific for pathogenic enteric bacteria (table VI)

Results of antibiotic sensitivity tests (Chloramphenical, Erythromycin, Streptomycin, Kanamycin, and Tetracycline) showed most Salmonella typhi sensitived to Chloramphenicol. Other organisms varied (table VII)

CONCLUSION

Taylor and Harris (1965) compared different enrichment (TSB., GNB., Siliker, SF., TT.) and plating media (EMB., Mc., XLM.) for culture of Shigella species. Media found suitable for Shigella species were EMB., XLM., Mc., TSB., GNB and Siliker broth.

Gerichter and Sechter (1966) isolated Salmonella species from bone meal, and found BS. better than SS. agar.

In this study, comparison of different enrichment media and plating media for recovery of medically important bacteria from human stool specimens showed that most Salmonella species could be isolated from SS., BG., and BS agar. Other enteropathgenic bacilli were most often isolated from Mc., EMB. and XLM. If direct plating was positive, the enrichment culture was positive, but if direct plating was negative, the enrichment culture was negative too.

In routine work, isolation of enteric bacilli must combine strongly inhibitory media (SS., BS., BG.) with less inhibitory media (Mc., EMB., XLM.) for maximum recovery of pathogenic bacteria,

Table. I Cultivation of Salmonella species.

Organisms	Direct culture on						culture in Broth			
	Mc	EMB	XLM	SS	BG	BS	HIB	GN	SB	TB
S. typhi S 1	pn	n	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ce	+ve
S. typhi S 2	pn	ps	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ve	+ve
S. typhi S 3	pn	pn	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ve	+ve
S. typhi B 1	pn	ps	pn	pn	pn	n	+ve	+ve	+ve	+ve
S. tyyhi B 2	pn	pn	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ve	+ve
S. typhi B 3	pn	pn	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ve	+ve
S. typhi U	pn	pn	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ve	+ve
S. typhi CI	pn	ps	pn	pn	pn	ps	+ve	+ve	+ve	+ve
S. typhi CI	pn	pn	pn	pn	pn	n	+ve	+ve	+ve	+ve

Table. II Cultivation of Shigella species.

Organisms	Direct culture on						Culture in Broth			
	Mc	EMB	XLM	SS	BG	BS	HIB	GN	SB	TB
Sh. dysentery 1	pn	pn	pn	n	ps	n	+ve	+ve	n	+ve
Sh. dysentery 2	pn	ps	pn	pn	pb	n	+ve	+ve	+ve	+ve
Sh. flexneri 1	pn	pn	pn	ps	pn	n	+ve	+ve	n	+ve
Sh. flexneri 2	pn	pn	pn	ps	pn	n	+ve	+ve	n	+ve
Sh. sonnei 1	pb	pn	ps	n	pb	n	+ve	+ve	+ve	+ve
Sh. sonnei 2	pb	pn	pn	n	ps	n	+ve	+ve	n	+ve
Sh. boydii 1	pb	pn	pn	n	pn	n	+ve	+ve	+ve	+ve
Sh. boydii 2	pn	pn	pn	n	pb	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
alkalarescens Dispar.	pn	pn	pn	pn	pb	n	+ve	+ve	+ve	+ve

pn= positive normal size, ps= positive small size,

pb= positive big size, n= no growth.

Table. III Cultivation of **E. coli** and **Proteus morganii.**

Organisms	Direct culture on						Culture in Broth			
	Mc	EMB	XLM	SS	BG	BS	HIB	GN	SB	TB
E.Coli 0019:B14	pn	ps	pn	n	pn	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
Prot. morganii	pn	ps	pn	pn	pn	n	+ve	+ve	+ve	+ve

Table. IV Cultivation of **Vibrio cholera Eltor** (Inaba phage type 8)

Organisms	Direct culture on							Culture in Broth			
	Mc	EMB	XLM	SS	BG	BS	TA*	HIB	GN	SB	TB
Vicholera 2	pn	ps	pn	ps	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 3	pn	ps	pn	ps	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 4	pn	ps	pn	ps	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 7	ps	ps	pn	ps	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 10	pn	ps	pn	ps	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 13	pn	ps	pn	ps	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 14	pn	ps	pn	ps	pn	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 15	pn	ps	pn	pb	pb	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 16	pn	ps	pn	ps	pn	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 17	pn	ps	pn	ps	pn	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve
,, 18	pn	ps	pn	ps	pn	n	pn	+ve	+ve	+ve	+ve

* TA = Tellurite Agar for V. cholera (SEATO Laboratory)

Table. V Cultivation of pathogenic bacilli mixed with E. coli from human stools.

Organisms	Direct culture on						Culture in Broth			
	Mc	EMB	XLM	SS	BG	BS	HIB	GN	SB	TB
E. coli 0119 : B 14+S. typhi	E	E	E	S	E	E	E	E	S	E
E. coli+S. typhi	S	S	S	S	S	S	E	E	E	E
E. coli+Sh. sonnei	Sh	Sh	Sh	E	Sh	Sh	Sh	Sh	E	Sh
E. coli+S. typhi	S	S	S	S	S	E	S	S	S	E
E. coli+Sh. boydii	Sh	Sh	Sh	E	Sh	E	E	E	Sh	E
E. coli+Sh. flexneri	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh	E	Sh	Sh	Sh	Sh
E. coli+S. para C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Table VI. Isolution of enteropathogenic bacteria from patients.

Organisms	Direct culture on						Culture in Broth			
	Mc	EMB	XLM	SS	BG	BS	HIB	GNB	SB	TB
16, Sal. typhi	12	12	11	15	8	9	14	15	14	15
2, Shig. dysentery	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
12, Shig. flexneri	9	8	6	9	6	1	8	9	6	3
4, Shig. sonnei	4	3	3	2	2	4	4	3	4	2
11, Prot. morganii	6	5	4	5	3	0	5	8	8	4

Table VII. Susceptibility of enteropathogenic bacteria to antibiotics.

Organisms	Chloram			Erythro.			Strepto.			Kana			Tetra.		
	S	In	R	S	In	R	S	In	R	S	In	R	S	In	R
16, Sal. typhi	14	2	0	0	1	15	1	1	14	11	5	0	14	2	0
2, Shig. dysentery	1	0	1	0	0	2	1	0	1	1	0	1	1	0	1
12, Shig. flexner	4	0	8	0	1	11	0	2	10	4	6	2	4	1	7
4, Shig. sonnei	2	0	2	0	0	4	0	1	3	2	2	0	2	1	1
11, Prot. morganii	0	1	10	0	0	11	0	1	10	1	5	5	0	1	10

S = Sensitive, In = Intermediate, R = Resistant.

References

1. Ball, J. and Water Sellers.: Improved Motility Medium, App. Micro, 14:670, 1966.
2. Belliveau, R.R., Grayson, J.W. and Butler, T.J.: A rapid Simple Method of Identifying Enterobacteriaceae, Tech. Bul. Reg. Techno. 38:152-154, 1968.
3. Borchardt, K.A.: Scheme for Screening and Identifying Enteric and other Gram negative bacteria Using Reagent Impregnated strips, Tech. Bul. Reg. Techno. 38:150-157, 1968,
4. Christle, A.B.: Treatment of tyhpoid Carrier with Ampicillin, Brit. Med. J. 1: 1609-1611, 1964.
5. Croft, C.C. and Miller, M.J.: Isolation of Shigella from rectal swab with Hajna GN broth, Am. J. Clin. Patho. 26: 411 417, 1956.
6. Gerichter, C.C. and I. Sechter,: Comparison of Methods for Isolation of Salmonella from Bone meal. App. Micro. 14: 711-715, 1966.
7. Joe, L.K.: The dried filter paper technique for sending stool specimens to A laboratory for Bacteriology Examination. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5:133, 1956.
8. Taylor, I. W.: Isolation of Shigella 1. Xylose lysine agar; New Media for Isolation of Enteric pathogens. Am. J. Clin. Patho. 44:471-475, 1965.
9. Tayler, I.W. and Harris. B.: Isolation of Shigella II. Comparison of plating Media and enrichment broths, Am. J. Clin. Patho. 44;476-479, 1965.

โรคที่ต้องการบำบัดร่วมทั้งภรรยา และ สามี

LEUCORRHEA

WOMEN

LEUCORRHEA

T. VAGINALIS

T. VAGINALIS

MEN

AS CARRIERS

ตัดวงจรนี้ด้วย **FLAGISEPT** ORAL TABLETS

(METRONIDAZOLE)

ใช้ร่วมด้วย.. **VAGISEPT** VAGINAL TABLET

(THIMEROSAL)

ราคาประหยัด เหมาะสำหรับเวชกรรมทั่วไป

บริษัท แอล. พี. แสตนดาร์ด แลบบอราทอรี่ส์ จำกัด

218/1 ซอยศาลเจ้าเจ็ด เจริญกรุง พระนคร โทร. 31910

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

SERUM LIPOPROTEIN ELECTROPHORESIS *

Pramot Wanitthanakon, B.Sc. (Med. Tech.) **
Muni Keoplung, M.D.
Nantaya Waiwattana, B.Sc. (Med. Tech.)

Abstract.

A simple and rapid method is described for separating the serum lipoproteins into clear, discrete, and reproducible bands by electrophoresis on cellulose acetate. Lipoproteins were fractionated into chylomicrons, beta, pre-beta, alpha-lipoprotein and albumin bound fatty acids. Quantitation was accomplished by staining the membranes with Oil Red O and scanning with The Beckman Analytrol. Sera of patients with primary or secondary lipidemias show definite patterns reflecting changes in lipid metabolism

Introduction

Lipoproteins are conjugates complex of specific protein and lipids, which are phopholipids, cholesterol, cholesterol esters, triglycerides (Neutral fats), fatty acids, sterols, carotenoids and fat soluble vitamin (A, D, E, K). They are generally distributed in living matter, cell nuclei, mitochondria, cell membranes, chloroplasts, egg yolk, milk and in the blood stream. (5)

Lipoproteins presented in the plasma have large molecules, ranged from approximately 20,000-10,000,000 molecular weight units and contain from 40-95% lipid respectively. They can be transferred across the membranous boundaries of cell, and the large molecules of them can be soluble in water by the hydrophilic portion, such as protein and phospholipids, and on the outside in contact with water, while the hydrophobic portion, such as the triglycerides, cholesterol are in the interior, sheltered from contact with water molecules. (10, 13)

* From the Department of Clinical Chemistry, School of Medical Technology, Faculty of Medicine Chiang Mai University.

** Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital.

(Part of this paper was submitted for the Bachelor Degree of Science 1971)

Oncley et al found that the molecules of lipoprotein was spherical in shape and 185° A in diameter. Each of them is different in many properties, for example, solubility in water and ethanol-water mixtures, size and shape of molecules, electrostatic reaction and lipid content.

Composition of Lipoproteins

When plasma lipids are extracted with suitable lipid solvent. They can be separated into small groups of triglyceride, phospholipid, and cholesterol in nearly the same proportion. Small amount of unesterified long-chain fatty acid about 5% of total fatty a in normal plasma as shown in the table below:

Lipids of the blood plasma in man (8)

	mg/100 ml	
	mean	range
Total lipid	570	360–820
Triglycerides	142	80–180
Total phospholipid	215	123–390
Lecithin	–	50–200
Cephalin	–	50–130
Sphingomyelins	–	15–35
Total cholesterol	200	107–320
Free cholesterol (non-esterifeid)	55	26–106
Free fatty acids (non-esterifeid)	12	6–16

Hillyard & others (1955) studied the human serum lipoproteins by means of Ultracentrifugation, and analyzed each fraction for protein, phospholipid, free and esterified cholesterol, and triglycerides. The result was shown in the table below,

Percentage Composition of Lipoproteins in Man (8)

	Fraction		
	A	B	C
Density	1.063	1.063–1.107	1.107–1.220
Lipids :			
Phospholipid	21	29	20
Cholesterol free	8	7	2
Cholesterol ester	29	23	13
Triglyceride	25	8	6
Total lipid	83	67	41
Protein	17	33	59

Fraction A consists of B–lipoprotein, density below 1.063

Fraction B consists of a_2–lipoprotein, density between 1.063–1.107

Fraction C consists of a_1–lipoprotein, density between 1.107–1.220

From this study, the B - lipoprotein (Fraction A) has higher fat and lower protein, molecular weight about 1,300,000 in contrast, the lower fat and higher protein of a -lipoprotein, it has molecular weight about 200,000.

Therefore, the lipoprotein which have higher fat and lower protein must have lower specific gravity called Low - density lipoprotein (Sp. Gr. $<$ 1.063), and lipoprotein with higher protein and lower fat content, called High - density lipopretein (Sp. gr. $>$ 1.220).

Isolation

Plasma lipoproteins, stable, or unstable, are a heterogeneous group of compounds that can be separated into smaller groups by various ways:

1. Salting out
2. Ethanol salt fractionation
3. Precipitation by antibodies and non-specific polyanions
4. Chromatography
5. Ultracentrifugation
6. Electrophoresis.

The most significant methods are Ultracentrifugation and electrophoresis.

Ultracentrifugation (8, 10)

The lipoprotein classes may be isolated by floatation in the preperative ultracentrifuge by selection of the proper solvent density. The lipoproteins show different

rate of floatation when centrifuge in salt solution, and the migration can be measured and recorded photographically.

Lipoproteins are classified as having low density if they show floatation in salt solution of density 1.063. Those with densities between 1.063 and 1.21 are called high-density lipoproteins (HDL). The low-density fraction (LDF) is further subdivided on the basis of their floatation rate in Svedberg floatation unit, Sf. (1 Sf unit = 10^{-13} cm/second/dye/gm at 26°C). The subgroup Sf 0-12 is the highest of the low density fraction and is found in all plasma of all person. Another subgroup Sf 12-20 was first characterized by Gofman and was found in increased concentration. More recently, Gofman has included this subgroup in a broader low-density subgroup (Sf 12-400). This broad group, we shall see, represent basic low-density lipoproteins to which variable amounts of triglycerides have become attached.

Another two subgroups of plasma lipoproteins are Chylomicrons, which the density less than water, 0.96, and the Albumin-bound free fatty acids, consisting of 99% protein and 1% lipid.

Composition of the lipoproteins in plasma of man (8, 10)
(adapted from Obson & Vester, 1960 and Hoffman, 1970)

Fraction	Source	Density	Sf	Av. Conc., mg/100 ml	Electrophoretic Zone	Composition % Total lipid						
						Protein (%)	Total lipid (%)	Triglyceriee	Phospholipid	Cholesterol Ester	Cholesterol Free	Free fatty acids
Chylomicrons	Intestine	0.96	10^4-10^5	0–10		1	99	88	8	3	1	–
Low density lipoprotein												
LDF 1, VLDLP	liver	0.06–1.006	20–400	120	B	7	93	56	20	15	8	1
LDF 2		1.006–1.019	12–20	40	B	11	89	29	26	34	9	1
LDF 3		1.019–1.063	0–12	280	B	21	79	13	28	48	10	1
High density Lipoprotein												
HDL 1	liver	1.063	2		a_1							
HDL 2		1.063–1.125		40	a_1	33	67	16	43	31	10	–
HDL 3		1.125–1.210		240	a_1	57	43	13	46	29	6	6
Albumin–FFA	Adipose tissue					99	1	0	0	0	0	100

LDF = Low density fraction

HDL = High density lipoproteins

VLDLP = Very low density lipoproteins.

Electrophoresis

Electrophoresis of lipoproteins, though providing a measure of the net electrical charge carried by a given lipoprotein under the conditions of electrophoresis. The method use barbital buffer as a solvent and the support media can be starch medium, agar or agarose, filter paper and cellulose acetate.

There are 2 differences between lipoprotein add protein electrophoresis. The first is less amount of serum or plasma sample for protein electrophoresis than that of lipoprotein electrophoresis. And the second is the dye for staining. In lipoprotein staining we use fat soluble dye, such as oil red O (Sudan II), Sudan III, sudan IV, Sudan black or Fat red 7 B

Types of Lipoproteins (5, 7, 8, 10)

By the method of electrophoresis, lipoproteins are separated into 4 groups ;

(1) **Alpha lipoprotein** migrate the greatest distance from the origin with alpha-globulin and are composed of 20 % cholesterol and 80 % phospholipids. The concentration in plasma is about 3 % of plasma protein or 35 % total plasma lipoprotein, the density ranged from 1.063 - 1.210. Hydrated a - lipoprotein, contains 15 % water and molecular weight is about 165,000-400,000.

Oncley, Scatchard and Brown studied a - lipoprotein by the method of light-scattering and viscometry and found that it is oval in shape, about 300×50 °A (5, 7)

a -lipoprotein is stable substance consisting of higher phospholipid and protein than the other lipoproteins. It is soluble in fat solvent to form a protein and small amount of phospholipid, but it can not be precipitated by polyanions.

In comparison with B-lipoprotein, they are composed of nearly the same amount of fatty acid, the ratio of sphingomyelin and lecithin is 0.2 by weight but there are more esterified cholesterol and phospholipid in a - lipoprotein (7)

(2) **Beta lipoprotein** migrate with B-globulin. There are about 5% ofplasma protein or 75% tatal plasma lipid, the density is between 1.006-1.063 or 1.03 in average. By ultracentrifugation, the most part is separated in Sf 0-12 fraction.

There are no a - but B-lipoprotein in newborn infant plasma, which composed of 60 % cholesterol.

B-lipoprotein consists of 20-25 % by weight, 8 % cholesterol, 35 % esterified cholesterol, 22 % phospholipid, 10 % triglyceride and small amount of fatty acid. The ratio of sphingomyelin and lecithin is 0.4. B -lipoprotein is oval in shape, about 15×350 °A, and molecular weight of $1.3\text{-}32\times10^{6}$

B - lipoprotein forms cholesterol and glycerides with cold ether or n-heptane.

Robert and Szezo found that some of hormones estrogen, estriol, progesterone and fat soluble carotenoid are carried by the B-lipoprotein.

(3) **Pre-beta lipoprotein** migrate sligh-ty ahead of the B-fraction and has the density of 0.06 to 1.006 or VLDLP (Sf 20-400).

Pre - B - lipoproteins are composed of 85% lipid, mostly triglycerides and 2-15% protein. (7)

(4) **Chylomicrons** will not move at all in the electric field. They have the least density of 0.96% and Sf less than 400 chylomicrons can be seen under dark field or electron microscope, they are spherical in shape, 0.1-5.0 microns, but circulating chylomicrons are not larger than 1 micron (7, 8)

Chylomicrons are composed of triglycerides, arounded with phospholipid, cholesterol and small amount of esterified cholesterol, and the protein content is about 0.5-2.5% by weight.

In general, the method of electrophoretic separation of lipoproteins can be done by 2 ways, paper and cellulose acetate methods.

(1) **Lipoprotein by paper electrophoresis** Straus and Wurm separated lipoproteins and fixed them by heating at 107-120°C, then stained lipid with fat red 7B decolorized the background in sodium hypochlorite. The evaluation can be done by densitometry or photometrically.

Less and Match (11) found that the lipoprotein resolution was better when using buffer containing 1 : 100 albumin solution (w/v) due to reduction of adsorption of protein by the filter paper. The lipoproteins are separated into 3 fractions; a - ,pre-B and B-lipoprotein.

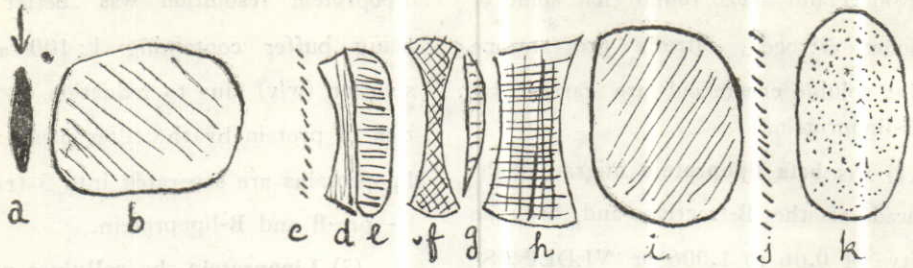
(2) **Lipoprotein by cellulose acetate :** This method is convenient, less time consuming and more distinct than the paper electrophoresis method.

Many workers had studied about the lipid staining solution. Colfs and Verheden used sudan black as a staining, and then the other used Schiff's staining.

Chin and blankenhorn separated 5 - 10 microliter plasma by running electrophoresis for 90 minutes, then stained overnight with oil red 0 dye solution and cleared with glycerol and evaluated them by scanning.

Another workers used cellulose acetate (Sephraphore III, Gelman instrument Co.) as a supporting media. The time of electrophoresis was about 15 - 20 minutes at 200-250 voltages. The lipoproteins are separated into 4 bands, chylomicrons, beta, pre-beta and alpha-lipoprotein.

Raymond E. Becking Jr. and Ralph D. Ellefson (3) used cellulose acetate (Gelman Sephraphore III) for separating 0.75 microliter of serum at 300 volt for 45 minutes. They compared the separated fraction on cellulose acetate with ultracentrifugation method and classified them as follow :



Arrow = Point of application

a = Chylomicron

b = Gamma-lipoprotein

c = plasma "fibrinogen" lipoprotein

d = beta - lipoprotein 2

e = beta - lipoprotein 1

f = very low density pre beta lipoprotein 2

g = high density pre beta lipoprotein

h = very low density pre beta lipoprotein 1

i = alpha - lipoprotein 2

j = alpha - lipoprotein 1

k = albumin - bound fatty acids

Disorders of lipoproteins (4, 7)

Disorders of lipoproteins is due to abnormality of lipid transport or metabolism. There are three types of abnormal lipid metabolism.

1. Dyslipidemia or Dyslipoproteinemia which have no lipid except fatty acid in the plasma.

2. Hypolipoproteinemia

3. Hyperlipoproteinemia

Lipoprotein deficiency States (4, 7)

These are :-

1. Abetalipoproteinemia due to poor absorption of lipid in infant stages. They always have mental retardation. The laboratory findidgs of plasma are marked lowering of cholesterol and glyceride. The beta - lipoprotein fraction cannot be seen by the electrophoretic method.

2. Hypobetalipoproteinemia. The lipid content in the plasma are lowered in phospholipid, cholesterol and glycerol. By electrophoresis, beta - lipoprotein fraction is below normal.

3. Alpha - lipoprotein deficiency. (Tangier disease). The laboratory findings are lowering in plasma phospholipid and cholesterol, but moderately high glyceride. Electrophoretic finding is absent of high - density alpha - lipoprotein.

Hyperlipoproteinemia (4, 7, 14)

Frederickson et al classified hyperlipo proteinemia by electrophoresis to 5 types as follow :-

Type I The serum is milky with characterized by marked increase in the cholesterol and glyceride. The electrophoresis shows excess pre-beta lipoprotein.

Type II Familial hypercholesterolemia, clear serum with markedly elevated cholesterol and normal to elevated of glyceride. The beta-lipoprotein is increased by electrophoretic method when the pre-beta is increased or normal.

Type III There are moderately elevated of cholesterol and variable to elevated glyceride (familial endogenous hyperlipemia) which produce turbidity of serum. Electrophoresis shows increase in "Floating" B-lipoprotein.

Type IV The serum is turbid with usually elevated glyceride of endogenous or "carbohydrate-induced" and slightly elevated cholesterol. The electrophoresis shows hyperpre-beta lipoprotein.

Type V This is a mixed type of exogenous and endogenous origins. There is hypertriglyceridemia. The electrophoresis shows hyper pre B-lipoproteinemia and hyperchylomicronemia.

Secondary hyperlipoproteinemia, similar to Type V by electrophoresis study. For example, Diabetes mellitus, Acute alcoholism and chronic pancreatitis.

Materials and Methods

The method we used in this experiment is of the Fletcher and Styliou (6), but instead of Sephraphore III cellulose acetate we used Beckman Cellulose acetate as for the protein analysis. And because of poor separation when 0.25×3 ul serum was used, so we applied more sample. The 0.25×7 ul. serum showed the best separation. All serum specimens were obtained during postabsorptive period.

Results

The serum lipoproteins are separated into small fractions of chylomicrons, B, pre-B, a-lipoprotein and albumin-bound fatty acids.

From 24 normal serum samples, we got 0% chylomicrons, 30-70% B-lipoprotein (average 48.2%), 2.7-20.8% pre-B-lipoprotein (average 11.4%), 2.0-13.0% a-lipoprotein (average 9.5%) and 9.5-52.6% (average 30.9%) of abumin-bound fatty acids.

The experiment was done on the sera of various conditions. The results obtained are already shown in Figure 1-12

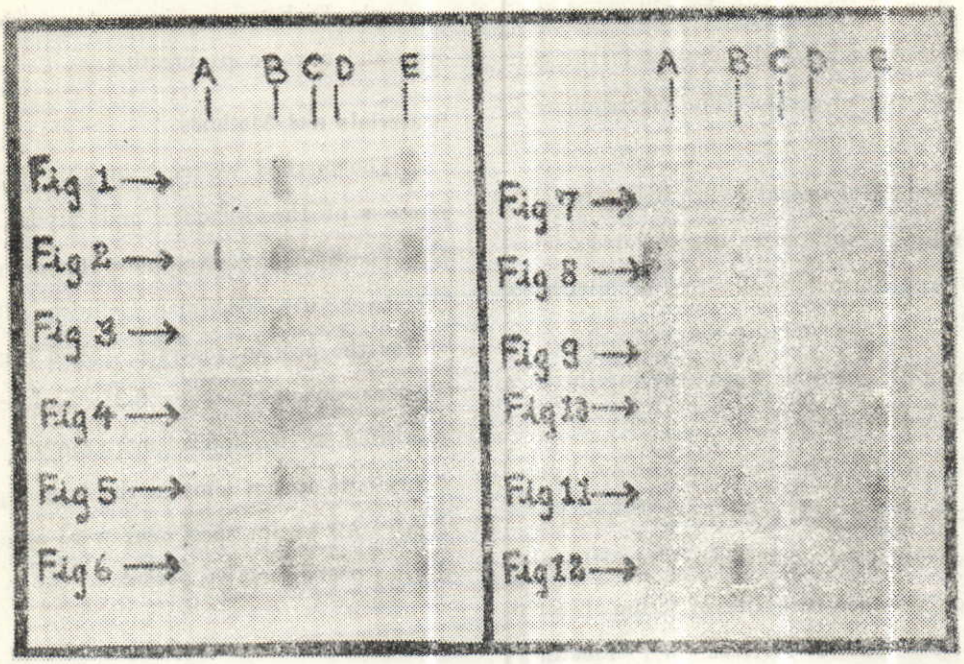


Fig. 1–4 shows serum lipoprotein patterns in normal persons.

Fig. 5–6 shows slightly increased B–lipoprotein and markedly elevated pre–B–lipoprotein in case of Diabetes mellitus.

Fig. 7–8 Jaundice serum with increased or normal B–lipoprotein but decreased or absent of pre–B–lipoprotein.

Fig. 9 is the lipoprotein pattern of cirrhotic serum which has low B–lipoprotein and absent of a–lipoprotein,

Fig. 10–11 show markedly elevated of B– and a – lipoprotein in Multiple myeloma.

Fig. 12 The condition of hypercholesterolemia shows the elevation of B– and a – lipoprotein but lowering of pre – B – lipoprotein.

Discussion

with the improved resolution of the lipoprotein by electrophoresis on the cellulose acetate, this method diluted 1 package of Beckman buffer B-2 to 1,400 ml. instead of 1,000 ml. Decreasing in the ionic strength of the buffer enhances the resolution of lipoprotein in the following ways:

1. Lengthens the overall pattern.
2. Separates " fibrinogen " lipoprotein

from beta-lipoproteins by moving it closer to the origin. But in this experiment we used serum, so there are no fibrinogen shown at all.

3. Separates beta-lipoprotein into 2 components, B_1 and B_2-lipoprotein.

4. Spreads out and separates pre-beta and alpha components.

Stain which is not freshly made or stain which has been used previously gives a poorly-stained pattern. The freshly-made, supersaturated, aqueous-alcoholic solution of oil red 0 give excellent staining. Fifteen minutes of staining give the best result; staining for longer period leads to decreased intensity in chylomicron and alpha components.

Freshly prepared decolorizing solution can not remove all dye from the background of the membrane. Excessive exposure may result in decolorization of lipoprotein, especially in the chylomicron and alpha components. This bleaching stopped quickly by transferring the membrane to the series of acetic acid washes when the desired level of decolorization and intensification is reached. Clearing the membrane at over 80°C may cause the fuse of the membrane to the glass. The presence of glycerol on the glass-plate or in the solution will impair the clearing of the membrane.

In our experiment, we used Beckman cellulose acetate membrane, but Gelman Spiraphore III cellulose acetate gives clearer background.

Evaluation of sample can be done by Densitometry as in the protein study. The comparison between normal serum and different diseases which involve the lipoprotein metabolism, we shall see the different of the components only in chylomicron, B, pre-B and a-lipoprotein. A rather intense band in the position of albumin is found in this method. The band shows marked intensification during the bleaching procedure. The exact nature of this component is being investigated (6); it may represent albumin-bound free fatty acids.

Conclusion

Scanning of the 24 normal serum shows chylomicrons as 0% B-lipoprotein 48.2% (range 30.4-70.3%), pre-B-lipoprotein 11.4% (range 2.7-20.8%), a-lipoprotein 9.5% (range 2.0-13.9%) and albumin bound fatty acids 30.9% (range 9.5-52.6%).

In condition of primary lipidemia, i.e., hypercholesterolemia shows significant elevation of a- and B-lipoproteins but low pre-B-lipoprorein.

Secondary lipidemia, as in Diabetes mellitus related with slightly high B-lipoprotein and marked elevation of pre-B lipoprotein. There are high B-lipoprotein but low or absent of pre-B lipoprotein in jaundice. In Multiple myeloma shows marked elevation of both B- and a-lipoprotein.

The detailed modification of the method being used in this study was also discussed.

REFERENCES

1. Beckman : Model R - 101 microzone electrophoresis cell, Intruction manual RM-IM-3, August 1965.
2. Beckman : Model R - 100 microzone electrophoresis system RM-TB-010 A, August 1968.
3. Beckering, Jr., R.E., and R.D. Ellefson: A rapid method for lipoprotein electrophoresis using cellulose acetate as support medium. Am. J. Clin. Patho. 53 : 84 - 88, 1970.
4. Davidsohn, I., and J. Henry : Todd - Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory method. 14 th edition : 563-570, 1970.
5. Deuel, Jr., H J. : Lipid II : 370 - 378, 1951.
6. Fletcher, M. J. and M. H. Styliou : A simple mathod for separating serum lipoproteins by electrophoresis on cellulose acetate. Clinical Chemistry, Journal of the American Association of Clinical Chemistry : 362-365 May 1970.
7. Fredrickson, D.S., R.I. Levy, and R.S. Lees : Fat transport in Lipoprotein - an integrated approach to mechanisms and disorders. New Eng. J. Med, 276: 32-44, 94 - 103. 148 - 156, 215 - 226, 273 - 281, 1967.
8. Harper, H.A. : Review of Physiological Chemistry. 11 st edition: 39, 178, 170, 251, 268, 269, 1967.
9. Henry, R.J. : Clinical Chemistry. Principle and Technics : 246-253, 1964.
10. Hoffman, W.S. : The Biochemistry of Clinical Medicine. 4 th edition : 141-145, 1970.
11. Lees, R.S., and F.T. Hatch : Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin-containing buffer. J. Lab. Clin. Med. 61: 518-527, 1963.
12. Ross, D.J., and K. Brown : Lipoprotein fractionation by electrophoresis on cellulose acetate. The American Journal of Medical Technology. 35(9): 540 - 548, September 1969.
13. White, A.,P. Handler, and E. L. Smith: Principle of Biochemistry. 4 th edition: 729 - 720, 1968.
14. Kuo, P.T., : Hyperlipemia in atherosclerosis : dietary and drug treatment. The Med. Clin. of North American. 54 : 657, 1970.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

INCIDENCE OF RABID DOGS IN CHIANG MAI PROVINCE

Prayool Inboriboon, B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc. *
Kampol Panas-Ampol, M.D. *

Abstract

Sellers' stain and immunofluorescent staining were employed to detected Negri bodies or rabies antigen in dog's brain for rabies diagnosis. From 1966 to 1971, one hundred and sixty five dog's brains were examined and 119 (72.1%) were positive. The incidence slightly increased in winter and early summer and most of the specimens came from Amphur Muang. The correlation between findings using Sellers' stain and immunofluorescent staining is fairly good. Thus Sellers' stain seems to be useful in local laboratories.

INTRODUCTION

Rabies is one of the most dangerous infectious diseases and is caused by a virus. It is endemic throughout the world and is a major public health problem. Transmission of disease to man occurs by the bite of a rabid animal. Every year in Thailand many people die from rabies infection, having been bitten by rabid animals. Dogs are the most important vector of the disease to man. This is a major problem because in our country there are many dogs, both stray and house-hold dogs. These dogs are usually closely associated with man and most of them are not vaccinated against rabies, so the chance of being infected by and of transmittry further,¶ the rabies virus is higher.

In addition to dogs there are also many other animals that can transmit the disease; Phuangsab, A. et. al. (1) found that 14.7% of rats, squirrels and a skunk-like animal, trapped in Chiang Mai Province, were highly likely to be harbouring rabies antigen in their brains.

This paper reports our findings on the incidence of rabid animals, especially dogs that are caught after biting patients, and the heads brought to our laboratory for rabies examination.

MATERIALS AND METHODS

Samples in this study were brought

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

to the laboratory from different parts of Chiang Mai Province by the patients. Age, sex and history of the dogs and patients were noted if available. After the samples had been recieved in the laboratory, the brains are removed with caution, and kept in the refigerator when these was to be any deley before examination.

Preparation of Slide

Impression smear slides were prepared from the brain tissue, Ammon's horn in the case of dog's brain. About six small transverse sections (2-3 mm in thickness) of Ammon's horn were placed on a wooden tongue - depressor, the cut surface facing upward. Then clean slides, at least two, one for Sellers' stain and one for immunofluorescent staining, were pressed on the sections.

Identification of Negri Bodies

a. **Sellers' Stain** (2) While the impression smear was still moist, the slides were immediately immersed in the stain solution (1 part of 1% Basic fuchsin in absolute methanol + 2 parts of 1% Methylene blue in absolute methanol) for 1-5 seconds, depending on the thickness of the smear, then rinsed quickly in running water and air dried without blotting. They were then examined with the microscope.

Negri bodies are stained cherry red with deep blue granules, usually intracytoplasmic, which can differentiated from other inclusion bodies, particularly those produced by distemper virus (intracytoplasmic without granules).

b. **Immunofluorescent stainirg** (2) The impression smear was fixed in cold acetone and kept in the deep freeze at -15° C to -20° C, for at least two hours, but overnight was found to be best. After fixation, the slide was removed and air dried, then stained with 2-3 drops of working conjugated antirabies globulin * spread carefully over the film with loop, and incubated in a moist chamber at 37° C for thirty minutes.

After incubation, the smear was washed with PBS (0.1M, pH 7.4) twice, five minutes each time, air dried and mounted with 50% buffered glycerol (pH 7.6). Finally the smear was examined with the fluorescent microscope.

Negri bodies or rabies antigen stains greenish-yellow.

RESULTS

Sellers' stain and immunofluorescent staining were employed in this study. From 1966 to 1971, 165 specimens were examined and 119 were positive (72.1%) (Table I). The incidence increased from year to year and seems to be slightly increased in winter and early summer (Table II).

Regional, sex and age distributions of rabid dogs are indicated in Table III and IV, respectively. The incidence in Amphur

* BBL Division of Bioquest, Cockeysville, Maryland

Muang was highest and most of them are in the municipal area. All age groups of either sex are susceptible to infection.

The correlation between positives found by Sellers' stain and immunofluorescent staining is fairly good, only three specimens being found positive by immunofluorescent staining only (Table V). However these three specimens had been delayed before reaching our laboratory, and had liquefyied which tended to make an examination of doubtful value.

From 84 rabid dogs, 58 (69.1%) were household dogs and 26 (30.9%) were stray dogs.

Table I Results of rabies examination on dog brains in Chiang Mai Province, 1966–1971

Years	No. of specimens examined	No. of specimens positive
1966	11	7
1967	2	1
1968	14	10
1969	27	17
1970	51	39
1971	60	45
Total	165	119 (72.1%)

Table II Monthly incidence of rabid dogs : Jan. 70–Dec. 70 and Jan. 71–Dec. 71; Chiang Mai

Months	1970		1971	
	No. examined	No. positive	No. examined	No. positive
January	6	4	8	7
February	5	5	6	5
March	3	3	7	5
April	7	4	5	4
May	6	5	3	3
June	3	3	4	2
July	–	–	3	1
August	1	1	2	1
September	7	5	7	6
October	4	3	4	3
November	3	2	4	3
December	6	4	7	5
Total	51	39(76.5%)	60	45 (70%)

Table III Regional distribution of 84 rabid dogs, Chiang Mai, 1970 and 1971

Amphurs	No. positive	Per cent
Muang	66	78.6
Sansai	4	4.8
Mae Rim	4	4.8
Doi Saket	4	4.8
Sankampang	3	3.6
Sarapee	2	2.4
Jom Thong	1	1.2
Total	84	100

Table IV Sex–Age distribution of 72 rabid dog*

	No. positive	Per cent
Male	45	62.5
Female	27	37.5
Age 1–3 months	8	11.1
4–6 months	13	18.1
7–11 months	5	6.9
1–2 years	27	37.5
Over 3 years	19	26.4

* Detailed information on 12 rabid dogs is not available

Table V Correlation between Sellers' stain and Immunofluorescent staining (FA.)

No. of specimens examined/No. positive	Pos. to Sellers' stain only	Pos. to FA. staining only	Pos. to both Sellers' stain &FA. staining
111/84	0	3	81

DISCUSSION

Rabies cases and deaths in man have increased in Thailand from year to year, for an example, from 181 cases in 1959 (Northern 28 cases) to 311 cases in 1969 (Northern 50) (3). Rabies in domestic animals has also increased (4). As is well known, after clinical symptoms of rabies have developed the mortality rate is 100%. In persons exposed to rabies, particularly those bitten by rabid animals, prophylaxis is usually carried out by vaccination, often combined with antirabies serum, especially in severe cases. Although vaccination is usually effective there are also dangerous complications, such as encephalitis, particularly with brain-tissue containing vaccine (5). So that before vaccination it is better to know wheter the animal was rabid or not. It is very important to keep any suspected animal under observation for at least 10 days after it has bitten some person because rabid animals usually develop signs of rabies within five days. If the animal is dead, the definite diagno-

sis of rabies is carried by two methods. The first one is to detect Negri bodies or rabies antigen in brain tissue and the other one is to isolate rabies virus from the brain or saliva. In detecting Negri bodies in brain tissue two methods are employed, Sellers' stain and immunofluorescent staining (2). Sellers' stain is a simple and rapid method but sometimes lacks sensitivity and specificity because in some viral diseases, such as distemper, intracytoplasmic inclusions may be found and these were difficult to differentiate from Negri bodies. Immunofluorescent staining is more sensitive and specific although it is usually time consuming. However, the modification of the original method is more rapid (6). So these two methods should be carried out together. In the experiments reported here if only Sellers' stain has been used three positive brains would have been missed. However, as mentioned before, those brains were liquefied, which made the possibility of examination doubtful.

However, these methods can not differentiate whether the virus is alive or dead. The best and most definite diagnosis is to isolate rabies virus from the brain and sailva by injection into mice, intracranially. Unfortunately, this method was not performed in our study.

From the experiments reported here the incidence was found to increase from year to year, as also reported by SMRL(4). This may result from many factors. Education is one factor, increase of the incidence may indicate that the people know about this disease better than formaly, and go to see the doctor when they are bitten by a suspicious dog. From 1966 to 1971, only 165 specimens were examined. The number would have been higher if communications and education in the remote areas were better. This study confirmed this fact, because most of our specimens came from the Amphur Muang, particularly the municipal area. Although the specimens examined were small in number, the positive incidence was high (72.1 %). It may be the fact that most of these specimens were very highly suspected of having rabies. These dogs had bitten patients, and had been killed and brought to our laboratory.

The incidence in winter and early summer was found to be slightly increased, and higher in male than in female dogs. This is probably because this period is the breeding season, and dogs usually come together, particularly male dogs, so that the possibility of infection is higher.

About sixty nine per cent of the rabid dogs discovered were household dogs, and only 31 % were stray dogs and all age groups were found to be susceptible. It may appear that household dogs are more susceptible than stray dogs, but it is not true because most household dogs are free

to go about, and are not vaccinated, so that this situation is not different from that of the strays. But when household dogs became rabid, the opportunities to bite man are higher than with stray dogs, and the possibility of capture greater.

In the control of this disease, many things have to be done such as the elimination of stray dogs by capture, poisoning, or shooting, and immunization of household dogs. Immunization is very difficult because it can be carried out only in certain provinces, where supplies of rabies vaccine are available. Finally, health education should also be given to the people.

REFERENCES

1. Phuangsab, A., Panasampol, K., Lawhaswasdi, K., and Le Beau, L. J., Rats as a Reservoir of Rabies in Chiang Mai, J. Med. Ass. Thailand, 50:26-36, 1967.
2. WHO monograph series number 23, Laboratory Techniques in Rabies, 2 nd Edition, 1966.
3. Statistical report, Division of Vital Statistics, Office of the Under-secretary of Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand.
4. SEATO Medical Research Laboratory Reports, Bangkok, Thailand.
5. Appelbaum, E., Greenberg, M., and Nelson, J., Neurological Complications following Antirabies Vaccination, JAMA, 151 : 188, 1953.
6. Martin, J.E. and Bigwood, R. F., Jr., Rabid Fluorescent Staining Technique, Appl. Micro. 17 : 14-16, 1969.

ย่อความภาษาไทย
จากภาษาอังกฤษเบื้องต้น

ผู้ศึกษาได้รายงานถึงผลของการตรวจสมองสุนัขซึ่งคนไข้ได้นำมาขอรับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคพิษสุนัขบ้าหรือเปล่า โดยศึกษาตั้งแต่ปี 1966 ถึงปี 1971 สุนัขเหล่านี้ส่วนมากได้กัดคนไข้และถูกคนไข้ฆ่าตาย แล้วจึงนำมาให้ตรวจ ในการตรวจกระทำโดยการตรวจหา Negri bodies หรือ Rabies antigen จากสมองของสุนัขโดยเฉพาะบริเวณ Ammon's horn โดยวิธี Sellers' stain และ Immunofluorescent staining

ซึ่งผลปรากฏว่า สมองที่ตรวจทั้งหมด 165 ราย เป็นโรคพิษสุนัขบ้าเสีย 119 ราย (72.1%) ซึ่งสุนัขเหล่านี้ส่วนมากมาจากอำเภอเมือง สำหรับอายุของสุนัขนั้นปรากฏว่า เป็นได้ทุกวัยตั้งแต่ 2 เดือน จนถึงมากกว่า 3 ปี.

ด้วยอภินันทนาการ

จาก

บริษัท เซนทรัลวิสาหกิจ จำกัด

CENTRAL ENTERPRISE CO., LTD.

๑๓๔/๓ ถนนสุขุมวิท พระนคร

โทร. ๕๓๖๔๙

ผู้แทนจำหน่าย –

ANTI–INFLAMMATORY ENZYME PREPARATIONS.

KIMOTAB TABLET

CHYMOTASE INJECTION

เป็น PROTEOLYTIC ENZYME ที่มีคุณประโยชน์ กว้างขวางสำหรับใช้รักษาและป้องกันอาการบวม, ห้อเลือด, อักเสบ, ฟกช้ำต่างๆ เช่น Edema–swelling, hematoma associated with trauma such as fractures and sprains, postpartum breast engorgement, mastitis, postoperative inflammation.

MANUFACTURED BY :–

MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

TOKYO, JAPAN.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

Editorial

W.H.O. IMMUNOLOGY RESEARCH AND TRAINING CENTRE IN SINGAPORE.

The WHO Immunology Research and Training Centre was established in January 1969 in Faculty of Medicine, University of Singapore, Sepoy lines, Singapore 3. During the first eighteen months Dr. D.S. Nelson was director. He successfully conducted two regional training courses, and also completed some research on immunological aspects of nasopharyngeal carcinoma, leprosy and filariasis, before returning to the University of Sydney in June 1970. M.J. Simons arrived in Singapore in July, he is director now.

The Singapore WHO/IRTC. is the fifth regional centre established under the instigation of Dr. H.C. Goodman, chief of immunology, WHO, Geneva. It field of operation encompasses countries of the South East Asia (Burma, Ceylon, India, Indonesia, Maldives, Mongolia, Nepal and Thailand) and Western Pacific regions (Australia, China, Japan, Khmer Republic, Laos, Malasia, New zealand, Philippines, Republic of Korea, Singapore, Viet-Nam, Western Somoa,). It exists primarily to promote the use of immunological concepts and techniques in the investigation of world health problems, technique such as radioimmunoassay, which can detect molecules present in body fluid in very low concentrations, are just as useful in the investigation of hormonal, viral and even some forms of nervous system diseases.

The major event during the first three months of 1971 was the 3 rd WHO regional immunological training course. Twelve applicants from 9 countries in the South East Asia and Western Pacific regions received WHO Fellowships to enable them to participate in the ten week course. The course is a post-graduate level survey of modern concepts of basic immunology and will include thorough grounding in laboratory techniques. The topics covered will include; basic concepts of homoral and cell-mediated immunity and immunological tolerance; nature and preparation of antigens, preparation of antisera; nature of antibody reactions; measurements of antibody and immunoglobulin levels; complement measurement and biological properties; detection of antibody producing cell; mechanisms of immunological responses and morphology of immune system-function

mechanisms and measurement; reticuloendothelial system-functions and measurement of activity; allergic reaction -in vivo and in vitro models of immediate, Arthus and delayed-type hypersensitivity; transplantation immunity-clinical and experimental; autoimmunity clinical and experimental; teumour immunity; cell culture techniques. In addition each student will work on a special project.

The 4 th WHO regional immunology course is scheduled to commence on March 20, 1972 and continue for 3 months. The procedure for attendance at the course is that an application should initially in each of countries designated by WHO as in the South East Asia and Western Pacific regions.

Netr Suwankrughasn

Inolin

A New and Potent Bronchodilator

* Powerful bronchodilating action
* Rapid relief of symptoms from bronchial asthma or obstructive pulmonary diseases
* Wide margin of safety
* Cardiovascular side-effects are rarely encountered
* No influence on the central nervous system

A New Hemostatic

Adona (AC-17)

Carbazochrome sodium sulfonate

ADONA(AC-17) is a new water-soluble carbazochrome derivative exerting powerful hemostatic and capillary reinforcing action which can safely be administered in massive doses over long periods.

Tablet Injection

Sohamin G

with infusion sets

Pure L-form essential amino acids

L-Lysine HCl
L-Threonine
L-Methionine
L-Tryptophan
L-Leucine
L-Isoleucine
L-Phenylalanine
L-Valine
L-Arginine HCl
L-Histidine HCl
Glycine
Sorbitol

Protein supplement in

surgical operation, hypoproteinemia, gastrointestinal disorders, malnutrition, liver dysfuctions, etc.

Manufacturing Chemists
TANABE SEIYAKU CO., LTD.
Dosho-machi, Osaka, Japan

Glutathione Preparation

GLUTIDE

GLUTIDE contains a naturally occurring form of glutathione (reduced) being totally synthesized by Tanabe's new technical process.

Glutathione was first discovered from yeast by Hopkins in 1921, later found to be widely distributed in animal and plant cells. It is a biological tripeptide composed of L-glutamic acid, L-cysteine and glycine, having sulfhydryl group -SH. Glutathione is also present in our living cells, especially noticeable in liver, spleen, adrenal and erythrocyte.

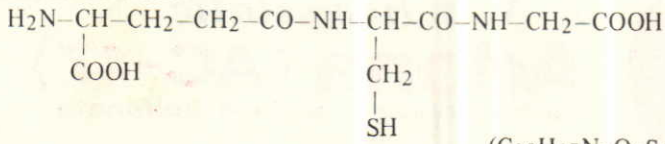
Clinical studies have been done in internal, surgical, obstetrical, pediatric, radiological and dermatological fields indicating its excellent therapeutic effects.

DESCRIPTION

Generic name: reduced Glutathione

Chemical name: r–L–Glutamyl–L–cysteinyl–glycine

Chemical structure:



$(C_{10}H_{17}N_3O_6S$: 307.33)

BIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ACTIONS

1. GLUTIDE promotes oxidation-reduction system of body and participates in production of energy.
2. GLUTIDE activates both inactive sulfhydryl enzymes and ferrous enzymes so that metabolism is stimulated well.
3. GLUTIDE acts as a coenzyme especially for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in glycolysis.
4. GLUTIDE activates enzymes which participate in glucuronide-, glycine- and mercapturate-cojugation and rhodanation so as to accelerate the detoxicating function of body.
5. GLUTIDE improves unbalance of acetylcholine-cholinesterase equilibrium so that one of the allergic conditions is well controled.
6. GLUTIDE antagonizes the formation of ethionine- or ethionamide-induced fatty liver.

Manufacturing Chemists

TANABE SEIYAKU CO., LTD.

21 Dosho-machi 3-chome, Higashi-ku

OSAKA, JAPAN

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

ย่อ และ รีวิวเอกสาร

The Hypereosinophilic Syndrome.

M. Lazni-cka. The medical Division of Hospital Uherske Hradiste, Czechoslovakia. Vnitrni. Lek. 16: 1046-1051, 1970.

ศึกษาถึงการที่มี Eosinophil สูง ร่วมกับกลุ่มอาการอื่น ๆ จากคนไข้หญิง 2 ราย ซึ่งทำ Eosinophilic count ได้สูงทั้งคู่ คนไข้รายที่หนึ่งพบว่า ตับโต ม้ามโต และ lymph nodes โตด้วย ผล serum electrophoresis ได้ค่า beta และ gamma globulin สูง ส่วนคนไข้รายที่สองพบจุด หรือคราบที่ปอด (Pulmonary infiltration) รายนี้ gamma globulin สูงกว่าปกติเล็กน้อย ทั้งสองรายนี้มีอาการดังกล่าวอยู่นานพอสมควร แล้วในที่สุดก็หายเป็นปกติ

ชลอ บัวน้ำจืด
B.Sc. (Med. Tech.)

Red Blood cell survival in Aplastic Anemia.

K. Popovic, R. Borota, and D. stanulovic. Clinic of Internal Disease, Novisad, Yugoslavia. Serbian Arch. Med. 97: 1295, 1969.

ในการทดลองหา RBC survival จากคนไข้ aplastic anemia ชนิดต่าง ๆ รวม 10 ราย โดยใช้ ^{51}Cr labeled ผลที่ได้คือ คนไข้ 6 ราย ที่เป็น idiopathic aplastic anemia ได้ค่า RBC half-life 6-23 วัน (ค่าปกติ 28-30 วัน) ยังพบอีกว่ามี correlation ระหว่าง RBC survival กับชีวิตของคนไข้ กล่าวคือ ถ้า RBC survival ยิ่งน้อยคนไข้จะยิ่งสิ้นชีวิตเร็ว แต่ใน aplastic anemia และ Osteomyelofibrosis ไม่พบว่ามี Correlation เหมือนคนไข้ 6 รายที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ชลอ บัวน้ำจืด
B.Sc. (Med. Tech.)

Identification of Blood Monocytes by Demonstration of lysozyme and Peroxidase activity

by Enni Syrin and Anna-maija Raeste From. Acta haemat. 45: 29-35, 1971

จากการทดลองหา lysozyme (muramidase) activity โดยวิธี cytochemical Method เพื่อแยก Monocyte และ lymphocyte

ผู้รายงานได้ทดลองจากหนู 5 ตัว โดยเอาเลือดจากหางหนูมา smear ย้อม Peroxidase และอีก 200-250 micro-liter ใส่ใน Tube EDTA เพื่อทำอย่างอื่นและพร้อมกันนี้ได้ทำในคนด้วย โดยทำจากคน 5 คนแต่ใช้

เลือดจากปลายนิ้ว และทำเช่นเดียวกับเลือดหนู

Peroxidase reaction ของ typical monocyte ในคน light yellow staining ของทุกส่วนหรือบางส่วน cytoplasm แต่ในหนูมี yellow granule 2–3 จุด ใน cytoplasm, Neutrophils และ eosinophils ในค่า + มาก และ basophils ในค่า –, lymphocyte ในคน – แต่หนูอาจมีค่า + เล็กน้อย ประมาณ 0–1 %

Lysozyme activity ของ typical Monocyte พบ zone ของ lysed bacteria (Micrococcus lysodeicticus) กว้างรอบๆ cell ในหนูก็พบเหมือนกับ Monocyte ให้ zone กว้างกว่า Neutrophil Eosinophil ส่วนมากไม่มี activity ส่วน lymphocyte ไม่มีเลย

Combined lysozyme และ Peroxidase activity ของ Mononuclea cell

6.9 % ของ rat mononuclear cells แสดง lysozyme –, Peroxidase + และ 1.0% ของ rat lymphocyte Peroxidase + แต่ส่วนมาก lysozyme –, Peroxidase + ใน monocytoid cells Monocyte ทั้งคนและหนูจะให้ lysozyme +, Peroxidase + และ lymphocyte ให้ lysozyme –, Peroxidase – เพราะฉะนั้น ทำให้แยก lymphocyte ออกจาก Monocyte ได้

อัญชลี กิตติชนม์ธวัช
B.Sc. (Med. Tech.)

The value of phenol red and chromic chloride as nonabsorbable gastric indicators.

R.J. Clarke and J. Alexander Williams

From Gut contents Vol. 12, No. 5, May 1971

ในการหา gastric nonabsorbable indicators เพื่อใช้ศึกษาในคน Ivey และ Schedl (1970) ได้เปรียบเทียบ absorbtion ของ $^{51}Cr\,Cl_3$, phenol red และ polyethylene glycol โดย human stomach ที่ pH_1 เขาพบว่าเกิด minimal absorption ของ indicators ทั้งสามที่กล่าวนี้จาก stomach เท่าๆกันทั้งหมดแต่ในตอนแรกๆ ที่ให้ indicators กับ stomach ทีละน้อย ตรวจพบว่า indicators หายไปบางส่วน อาจเกี่ยวกับ absorption ต่อ gastric surface หรือ Contents ที่มีอยู่ ซึ่ง indicator อื่นๆ ทั้งหมดก็จะเป็นเช่นนี้เหมือนกัน

ปัจจุบันได้ทำ quantitative assessment ของ comparative loose ของ $^{51}Cr\,Cl_3$ และ phenol red ที่เข้าสู่ mucus fraction ของ gastric secretion โดยใช้ Volunteers ที่สุขภาพแข็งแรง 7 คน(A→G) อายุระหว่าง 18–23 ปี ให้อดอาหารตลอดคืน

ใส่ Nasogastric tube ให้อยู่ในตำแหน่ง Antrum โดยดูจาก X-ray ดูด gastric content ออก ถ้าไม่ใสก็ล้างกระเพาะด้วยน้ำ แล้วทำใหม่ ให้ test meal ซึ่งมีส่วนผสมของ phenol red และ $^{51}CrCl_3$ ประมาณ 550 ม.ล. โดยทีแรกให้ 20 ม.ล. ก่อน เพื่อเป็น Control ต่อไปให้ดื่ม test solution เร็ว ๆ เท่าที่จะดื่มได้ ควรใช้เวลาดื่มน้อยกว่า 5 นาที เสมอ ดูด gastric samples 20 ม.ล. หลังจากดื่มไปแล้ว 5 นาที และดูดต่อไปทุก ๆ 15 หรือ 20 นาที แต่ละ specimen เอามาใช้ 10 ม.ล. ทั้งส่วนที่เหลือเพื่อกัน Contaminate ทำติดต่อกันจนกระเพาะว่าง ทุก sample เอาไป Centrifuge เพื่อแยกเอา Clear supernatant solution และ mucus ล้าง mucus เบา ๆ ด้วยน้ำกลั่น 2–3 ครั้ง เพื่อเอา supernatant ที่ติดอยู่ออกให้มากที่สุด mucus samples ทำเป็น 10 ม.ล. ด้วยน้ำกลั่น แล้วทำ microhomogenized ใน Potter–Elvheim glass homogenizer แล้วเอามา 4 ม.ล. ใส่ใน volumetric flask

100 ม.ล. สำหรับ phenol red analysis และอีก 4 ม.ล. ใส่ใน labelled tubes สำหรับ ^{51}Cr counting

เพื่อหาค่า phenol red ใส่ buffer solution (ประกอบด้วย trisodium orthophosphate 27.5 กรัม ละลายน้ำ 1 ลิตร) 12 ม.ล. ลงใน Volumetric flask ที่จะทำ phenol red analysis เติมน้ำกลั่นลงไปให้ถึงขีด 100 ม.ล. วัดสีม่วงที่เกิดขึ้นด้วย spectrophotometer ที่ wave length 560mu เทียบกับ Control ก็จะได้ผลของ phenol red แต่ละ specimen

เพื่อนับ ^{51}Cr เติมน้ำกลั่น 4 ม.ล. ใน labelled tube ^{51}Cr counting เพื่อใช้ estimate background radioactivity แล้วนำไปนับ ^{51}Cr จาก Nuclear Chicago gamma counter โดย Counts/min of sample (less background) ต่อ Counts/min control (less background) ดังนั้นทุก ๆ supernatant และ mucus sample ก็คำนวณหา ratio ของ ^{51}Cr ต่อ phenol red ได้

จากการทดลองปรากฏว่า $^{51}CrCl_3$ ได้สูญเสียไปโดยการ adsorption กับ mucus เป็นจำนวนมากกว่า phenol red ทำให้ phenol red ดีกว่าในการเป็น nonabsorbable gastric indicator.

เกรียงศักดิ์ อิ่มใจ

B.Sc. (Med. Tech.)

Skin Window Studies of the Inflammatory Responses of Neutropenic Patients.

By D.C. Dale and S.M. Wolff

Blood 38 : 138, 1971.

ผู้รายงานได้ศึกษาการตอบสนองของเม็ดเลือดขาว ต่อการอักเสบชนิดเฉียบพลันในผู้ป่วย Cyclic neutropenia 3 คน และผู้ป่วย Chronic neutropenia 15 คน เปรียบเทียบกับคนปรกติ โดยทำ Rebuck skin window techniqe พร้อมทั้งทำ leukocyte count และ differential white cell count ในเลือดควบคู่กันไปด้วย Rebuck skin window technipue ทำดังต่อไปนี้

- ทำความสะอาดท้องแขน (volar forearm) ด้วย 70% alcohol ทิ้งให้แห้ง
- ใช้ใบมีด (scalpel) ขูดผิวหนังจนถึงชั้น papillary layer ของ corium ให้มีความกว้างประมาณ 5×5 ม.ม.
- ใช้ cover slip แบบกลม ขนาด 18 มม. ที่ล้างพร้อมทั้งทำให้ปราศจากเชื้อเสร็จแล้ว ปิดลงไปบนแผล ใช้กระดาษแข็งสี่เหลี่ยมขนาดเท่ากันปิดทับลงไปอีกทีหนึ่ง เพื่อป้องกัน cover slip แตก แล้วใช้ปลาสเตอร์ปิดทับขอบกระดาษแข็งกับผิวหนังทั้งสี่ด้านให้แน่นสนิท
- เปลี่ยน cover slips ใหม่ทุกระยะ 1,3,5,7,9,12 และ 24 ชั่วโมง
- นำ cover slips ที่มี cellular exudate ย้อมด้วย Wright's stain แล้วทำ differential white cell count.

ผลที่ได้พบว่าจำนวน neutrophils ในระยะชั่วโมงที่ 3 และ 5 ตั้งแต่เริ่มต้นทำให้เกิดการอักเสบนั้น ขึ้นอยู่กับจำนวน neutrophils ที่มีอยู่ในเลือด นอกจากนี้ในระยะ Neutropenic phase ของผู้ป่วย Cyclic neutropenia และในผู้ป่วย severe chronic neutropenia ทั้งสองนี้ให้ผลการตอบสนองของ mononuclear cells ต่อการอักเสบเป็นปรกติ ผู้รายงานให้ข้อเสนอว่า ผู้ป่วยที่มี neutrophils ต่ำ แต่มี monocyte count ปรกตินั้น monocytes จะเป็นตัวสำคัญสำหรับทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อ (infection) ต่างๆ

ดำรงค์ พิณตานนท์

B.Sc. (Med. Tech.)

Comparison of Animal Sera for Suitability in Coagulase Testing

D.S. ORTH, L.R. CHUGG and A.W. ANDERSON.
Department of Microbiology, Oregon State University Corvallrs. Oregon 97331.

Applied Microbiology Mar. 1971 Vol. 21 No. 3 p. 420 - 425

ในการทำ Routine Coagulase Testing เพื่อตรวจหาเชื้อ Staph. aureus ที่เป็น pathogenic Organiams โดยทั่วไปแล้วมักจะกำหนดให้ใช้ Rabbit plasma กัน แต่การใช้ Rabbit plasma มักไม่นิยมทำใน Plate ทดลองเนื่องจาก Staphylokinase (SK) และ Staphylococcal Muller factor (MF) จะทำให้เกิด Fibrinolysis และ False negative reaetions ได้ ดังนั้นผู้รายงานจึงได้เริ่มทำการศึกษาเปรียบเทียบ Sera จากสัตว์ชนิดต่าง ๆ เพื่อหาความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทำ Coagulase Testing โดยอาศัยการตรวจหาจำนวนของ Coagulase-reacting factor (RCF) ที่อยู่ใน Sera สัตว์มากพอที่จะไม่ทำให้เกิด Fibrinolysis ใน plate ทดลอง

วิธีการทดลอง

1. ได้เปรียบเทียบดู CRF Activities จาก Sera สัตว์ชนิดต่าง ๆ แล้วอ่านผลโดยดู Fibrin halos รอบ ๆ colonies ของเชื้อใน 10 ชม. ก็จะพบว่าความเข้มข้นของ CRF มีความสัมพันธ์กันดังต่อไปนี้ Human มากกว่า pig มากกว่า Rabbit มากกว่า Horse มากกว่า Bovine, Chicken, และ Lamb และ Human, pig, Rabbit Sera จะมีจำนวน CRF มากพอที่จะใช้ทำ Coagulase Testing ได้

2. ได้ตรวจหา Qualitative ของ serum plasmin activity ใน sera ของสัตว์ต่าง ๆ ผลที่ได้ออกมา จากปฏิกิริยาแรงที่สุด จนไปถึงอ่อนที่สุดตามลำดับดังต่อไปนี้ Rabbit มากกว่า Human มากกว่า Lamb มากกว่า Horse มากกว่า Bovine, chicken และ pig ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Staphylococcal enzyme(SK,MF) จะไม่สามารถกระตุ้น pig, bovine และ Chicken Sera ให้เกิด Fibrinolysis ได้

ผู้รายงานได้สรุปว่า pig Serum มีคุณสมบัติเหนือกว่า Sera ของสัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่จะนำมาใช้ทำ Coagulase ใน plate ทดลอง และอาจนำไป Apply ใช้ใน Test Tube ด้วย นอกจากนี้ผู้รายงานยังได้ทำการทดลองหา Arginine esterase และ Plasmin activity ของ Rabbit กับ pig sera โดยใช้ L-Caseine เป็น Substrate ทั้งพบว่า Heparinized pig plasma จะมีความเหมาะสมมากกว่า Citrated pig plasma เนื่อง

จาก Citrate จะไป Interfere การเจริญของ Staph. aureus และ Heparin ยังช่วยป้องกันการเกิด False positive coagulase reaction ได้

จากรายงานนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงคุณสมบัติของ pig Serum และ plasma ที่จะนำมาใช้เป็นประโยชน์ใน Coagulase Testing ได้ผลดี ทั้งยังมีราคาถูกกว่าการใช้ Rabbit plasma อีกด้วย

จรัญ พานิชย์ศะศิลวัฒน์
นักศึกษาเทคนิคฯ ปีที่ 4

Paper—Electrophoresis Method for Estimating Urocanic Acid in urine

Domenico Barbieai, Iracema Alencastro da Silva, and Jose Nicolau Clin. Chem. 17 : 321 - 322, April 1971.

Urocanic Acid และ Formiminoglutamic acid เป็น intermediates ของ Histidine metabolism มีความสำคัญในการช่วย evaluate ผลของ histidine loading test ของพวก folic acid deficiency หรือใน conditions อื่นที่เกี่ยวข้อง วิธีทำมีดังนี้ หลังจากให้คนไข้กิน L – Histidine monohydrochloride 15 gms เริ่มเก็บ urine ในระหว่างนั้นจนครบ 8 ชั่วโมง acidified urine ด้วย 5 ml 1 N. HCl. นำ sample 20–40 microliter apply ลงบน whatman paper No. 1 strip แล้วทำ electrophoresis ใน Elphor apparatus ใช้ pyridine–acetate buffer (pH 5.4: 50 ml pyridine, 20 ml glacial acetic acid และน้ำกลั่นเติมให้ครบ 4 ลิตร) ที่220V. นาน 90 นาที เมื่อ dry strip แล้ว นำมา develop ด้วย Sodium Carbonate solution + Pauly's reagent (Sodium nitrite + sulfanilic acid)

ต่อมานำ strip ไปตัด ส่วนที่ correspond กับ urocanic acid migration ซึ่งจะรู้ได้โดยเรา run คู่กับ standard UA แล้ว elute โดย shake กับ alkaline methanol (Methanol + sodium carbonate) Cantrifuge solion ที่ได้แล้วนำไปอ่านใน spectrophotometer ที่ 450 milli–micron เทียบค่าที่ได้กับ known UA standard วิธีหา Formiminoglutamic Acid ก็ใช้ electrophoretic conditions เช่นเดียวกัน ต่างกันตรงวิธี development เท่านั้น

พัตราภรณ์ ชมเชิงแพทย์
B.Sc. (Med. Tech.), C (ASPC)

A Comparison of the Morphology of Lipid Absorption in the Jejunum and Ileum of the Adult Rat

Ralph A. Jersild, J.R. and Robert T. Clayton
The American Journal of Anatomy 131:481, 1971

ในการเปรียบเทียบ morphological aspects ของการดูดซึม lipid ที่ Jejunum, Ileum ส่วนกลางและส่วนปลาย โดยใช้ electron microscope เขาฉีด Physiological fatty chyme เข้าในลำไส้ของหนู ซึ่งผูกไว้เป็นส่วน ๆ ต้องเตรียมการทดลองนี้ในเวลา 5–30 นาที ผลปรากฏว่า morphological pattern ของการสะสม lipid ใน Jejunum และ Ileum ส่วนกลางคล้ายกันทั้งมีการ absorb และ transport มากมายแต่ที่ Ileum ส่วนปลายต่างออกไป แสดงให้เห็นถึง pattern ของ lipid ได้เปลี่ยนแปลงไป ตอนแรก lipid droplets จะสร้างขึ้นมากมายใน cytoplasmic mixture เช่นเดียวกับใน upper intestine และจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อมีการดูดซึมนานขึ้น ส่วน lipid droplets ใน Endroplasmic reticulum และ Golgi apparatus มีขนาดและจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับ upper intestine พบ droplets เล็กน้อยใน lamina propria แสดงว่าการ transport น้อยลงจะเห็นว่า morphological pattern มีความสัมพันธ์กับจำนวนการ synthesis ของ triglycerides ในแต่ละส่วนของลำไส้ แต่การสร้าง triglyceride และการเกิด membrane–bound droplets เหมือนกัน

บุญพะเยาว์ เลาหะจินดา
B.Sc. (Med. Tech.)

BUFFY COAT PREPARATORY TUBE.

Leonard S. Kaplow, M.D.
Technical Bulletin of the Registry of Medical Technology. Vol. 39, No. 5 1969

ในการศึกษา cytochemistry ของ leukocyte จำเป็นจะต้องเตรียม leukocyte ให้ได้จำนวนมากโดยใช้เวลาน้อยและอยู่ในตัวกลางที่ดี มีวิธีเตรียมง่าย ๆ โดยแยก leukocyte จาก buffy coat โดยการใช้ Folin Wu tube ซึ่งบรรจุ Whole blood ได้ 10–15 ml. buffy coat จะมีช่วงอยู่ในส่วนคอดของ Folin Wu tube ส่วนกว้างทางด้านล่างของ tube จะมีความจุอยู่ประมาณ 4 ml. ส่วนคอดของ tube มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.5 m m. จำนวน leukocyte ที่ได้จาก buffy coat ขึ้นอยู่กับ centrifical force และ hematocrite ของเลือดที่ใช้

วิธีทำ ใช้ 10 ml heparinize blood หรือ EDTA Anticogulated blood มา

centrifuge ที่ 2000 x g นาน15–20นาที buffy coat ที่ได้จากเลือดของคนแข็งแรงปกติ ที่มี leukocyte count ปกติจะมีส่วนสูงประมาณ 3–4 mm. และในคนไข้ leukemia ที่มี leukocyte count ประมาณ 150,000 cells/cu. mm. ส่วน buffy coat จะอยู่ในส่วนคอดของ tube เกือบทั้งหมด tube ที่ใช้เตรียม leukocyte จาก buffy coat นี้ ควรจะทำส่วนคอดของ tube ให้พอเหมาะ เพื่อจะสามารถแยกเอาส่วนน้อยของ leukocyte ออกได้ง่าย และมีจำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษา tissue culture, chromosome analysis, enzyme assays, lupus erythematosus, cell preparations, electron microscopy และ cytochemistry.

วารุณี คุณาชีวะ

B.Sc. (Med. Tech.)

Isolation of Shigellae : VIII Comparison of Xylose Lysine Deoxycholate Agar, Hektoen Enteric Agar, Salmonella-Shigella Agar, and Eosin Methylene Blue Agar with Stool Specimens

Taylor, W.I., and Schelhart, D.
Applied Microbiol. 21 : 32 - 37.

ผู้ศึกษาได้ทำการทดลองเปรียบเทียบ enrichment broths 2 ชนิด และ plating media 4 ชนิด ในการแยก Enteric pathogens ปรากฏว่า stool specimen ทั้งหมด 1,597 รายแยกเชื้อ Salmonellae ได้ 170 ราย และ Shigellae 17 ราย

Enrichment broths ที่ใช้คือ Selenite F broth และ Gram–negative broth ซึ่งปรากฏว่าถ้าใช้ Selenite F broth จะแยกเชื้อพวก Salmonella ได้ดีกว่า Shigella แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ gram negative broth จะแยกเชื้อ Shigella ได้ดีกว่า Salmonella แต่อย่างไรก็ตามการแยกโดยลง Enrichment broths ก่อน จะแยกเชื้อได้ดีกว่า direct plating ถึงสองเท่า

สำหรับ plating media ปรากฏว่า Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) และ Hektoen Enteric agar ใช้ในการแยกเชื้อทั้งสองได้ดีกว่า Salmonella – Shigella agar เล็กน้อย แต่ว่าดีกว่า Eosin Methylene Blue agar มาก

ทั้งนี้และทั้งนั้นการใช้ Media เหล่านี้ปรากฏว่ายังมี False positive ซึ่งเราก็รู้ได้โดยการ Identified ภายหลัง แต่สรุปแล้ว XLD เป็น media ที่ค่อนข้างดีที่สุด และวิธี Indirect plating โดยลง enrichment broths เสียก่อนดีกว่าวิธี Direct plating มาก

ประยูร อินบริบูรณ์

B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc.

Effect of varying The Cross match Procedure Upon Detection of Anti - D And Anti - Kell.

A. SIMMON, LCSLT

American Journal of Medical Technology Volume 37, Number 3 March 1971.

ในการทำ crossmatching วิธีทำมักจะเปลี่ยนแปลงไปต่าง ๆ ซึ่งขึ้นกับคำแนะนำของบริษัทที่ทำ reagents แต่ส่วนมากวิธีที่ทำมักทำตามคำแนะนำของ American Association of Blood Bank ซึ่งรวมวิธี saline method ที่ 37 ° C, high protein, indirect antiglobulin test, ตลอดจนการใช้ enzyme อย่างไรก็ตาม ยังเกิดข้อขัดแย้งขึ้นบ่อย ๆ ในการใช้ incubation times และ final concentation ของ high protein จึงได้ทำการทดลอง โดยใช้การหา Anti– D และ Anti–Kell โดยวิธี high protein และ antiglobulin test แล้วเปลี่ยน incubation times และ final concentration ของ protein ใช้ serum จากคนไข้ในโรงพยาบาลและจากที่จำหน่าย ใช้ serum ที่มี Anti–D 10 ราย และ Anti–K 5 ราย แต่ละ serum dilute ใน AB fresh serum ให้มี final concentration 1 : 256 ให้ทำปฏิกิริยากับ heterozygote cell ที่มีอายุไม่เกิน 7 วัน cell ที่ใช้เป็น group. O, R.r (DCe/dce) สำหรับ Rhesus system และ cell O,Kk สำหรับ Kell system ทั้ง 15 antisera test ที่ incubations ต่าง ๆ กัน จาก 15 นาทีจนถึง 90 นาที, และแต่ละ dilution test สำหรับ final concentration ด้วย จาก 9.0% ถึง 18.0 % โดยใช้ albumin 22% และ 30% เป็น initial concentration

การอ่านผลใช้วิธี semi – quantitative scoring โดยวิธีของ Dunford และ Bowley ซึ่งได้ผลดังนี้

ผลของ Final Protein Concentration

เมื่อใช้ Anti–D ใน high protein test system score จะสูงขึ้นเมื่อ final concentration ของ protein สูงกว่า 1.20% และ score ต่ำเมื่อ final concentration ของ protein ต่ำกว่านี้ และสูงสุดเมื่อมี protein 15% และจะต่ำลงเมื่อ protein เพิ่มขึ้นจนถึง 18.0%

เมื่อใช้วิธี albumin–fortified antiglobulin ความแตกต่างของ final protein concentration จะไม่ significance เท่ากับใน albumin test

พบว่า ระดับของ final high protein ระหว่าง 12.0% และ 18.0% เหมาะที่สุดสำ-

หรับ incubation time ที่ 15 นาที, 45 นาที และ 60 นาที

สำหรับ Kell system ทำปฏิกิริยาได้ดีใน albumin – fortified antiglobutin test โดยถ้ามี final protein level 15.0% และจะได้ผลน้อยลงถ้าระดับนี้ต่ำกว่า 12.0% ซึ่งจะปรากฏชัดเมื่อใช้ incubation time นาน 15 นาที

ผลของ Incubation Times

ถ้าหา Anti–D โดยวิธี high protein จะให้ผลน้อย ถ้า incubate น้อยกว่า 30นาที แต่ถ้าเกินกว่า 30 นาที ก็ไม่แตกต่างกันมากนัก, แต่ใน albumin–fortified antiglobulin technique ที่ incubation time เกิน 30 นาที จะให้ผลดีเมื่อมี protein level 12.0% หรือสูงกว่า, แต่ถ้าอยู่ในระหว่าง 9.0 % และ 12.0% การเพิ่ม inbubation time จะทำให้เกิด reactivity เป็นเส้นตรงจนถึง 90นาที

ส่วน anti–Kell พบว่าใน albumin–fortified antiglobulin จะได้ผลไม่ดีที่ incubation time 15 นาที หรือ 45 นาที แต่ 60 และ 90 นาทีจะได้ผลดี

ซึ่งพอจะสรุปได้ว่าในการหาทั้ง Anti–D และ Anti–Kell ครั้งนี้ final concentration ของ protein ที่พอเหมาะอยู่ในระหว่าง 12.0% และ 18.0% ซึ่ง protein ที่ใช้ควรใช้ 30% albumin. Incubation ที่เหมาะสมสำหรับ Antibodies ทั้งสอง คือ 60 นาที, สำหรับ incubation time 15 นาทีนั้นเกิดผลน้อยมากซึ่งอาจจะพลาด antibodies ที่เกิดช้าได้ จากผลที่ได้ แนะนำให้ใช้ incubation time 60 นาที ใน routine crossmatches

ในการทำ high protein crossmatch เพื่อหา incomplete antibody ที่มี Anti–D และ Anti–Kell เกี่ยวข้อง แนะนำให้ใช้ 1 volume ของ 5% Saline, suspened washed cell, 2 volume ของ serum และ 2 volume ของ 30% albumin สำหรับใน antiglobulin test ก็ใช้วิธีคล้าย ๆ กันนี้

สุรภา คันธากร

B.Sc. (Med. Tech.)

" Separation of Serum Alkaline Phosphatases by Micro Starch Gel Electrophoresis"

Michael J. Caputo, MT (ASCP), M. Sc.
And Donald M. TAFT, M.D.

The American Journal or Clinical Pathology.
56 : 220, 1971

ได้มีการทดลองหา pattern of serum alkaline phosphatases ในคนปกติและคนไข้ที่มีระดับ serum phosphatases สูง โดยวิธี micro starch gel electrophoresis ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธี gel electrophoresis starch gel

ทำจากการละลาย hydrolyzed potato starch ใน 0.08 M tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer แล้วปรับ pH ให้ได้ 9.0 ด้วย citric acid, starch flock มีขนาดกว้าง 8.2 cm ยาว 13.4 cm และหนา 0.6 cm ทำ slot ขนาดกว้าง 0.6 cm ได้ 6 ช่อง ช่องแรกใช้สำหรับ control serum ซึ่งใส่ Amido Black 10 B crystal ลงไปเล็กน้อยสำหรับเป็น albumin tracker ใช้ standard 0.06 M borate–NaOH buffer, pH 8.6 เป็น bride solution แต่ละ sample ใช้ serum เพียง 10 microliters ใช้เวลา run ใน electrophoresis cell ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้ว incubate ที่ 37 °C กับ substrate คือ 5 mM sodium–naphthyl acid phosphate และ 5 mM magnesium cholride in 0.05 M carbonate–bicarbonate buffer pH 9.8 ประมาณ 1 ชั่วโมง ย้อมสีอีก 1 ชั่วโมงด้วย tetra–azotiged 0–dianisidine (Fast Blue BB salt) ใน carbonate–bicarbonate buffer โดยวิธีนี้จะแยก alkaline phosphatase ได้ 5 zones คนปกติ คนไข้และเด็กจะมี pattern ต่างกัน pattern ที่ได้จาก serum ของคนไข้พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อโรค 3 กรุ๊ป คือ bone diseases, hepatocellular diseases และ biliary obstruction หรือ hepatic metastases ที่มีระดับ serum alkaline phosphatases ด้วย วิธีนี้เมื่อเปรียบเทียบผลกับวิธีของ Smithies (Biochem J 61 : 629–641, 1955) พบว่าคล้ายคลึงกัน แต่วิธีนี้ใช้เวลาน้อยกว่า คือประมาณ 5 ชั่วโมง และไม่ต้องอาศัย technic ในการทำมากนัก

จันจรี ศิริวิทยากร

B.Sc. (Med. Tech)

"Anergy And Tryptophan Metabolism in Hodgkin's Disease"

Vincent T. Devita, M.D., Bruce A. Chabner, M.D., David M. Livingston, M. D., and Vincent T. Oliverio, Ph. D.

The American Journal of Clinical Nutrition 24: July 1971, pp. 835-840.

Printed in U.S.A.

คนไข้ Hodgkin's disease จำนวน 43 คนทั้งที่เคยได้รับการรักษามาก่อน และไม่เคยได้รับการรักษา ได้รับการทำ tryptophan loading test และหาระดับค่า plasma pyridoxal phosphate (PALP) แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับค่าปกติ ที่ทำจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีจำนวน 18 คน และ 43 คนตามลำดับ test แรก ทำโดยเก็บปัสสาวะ 24 ชั่วโมงหลังจากให้ subject ดื่ม orange juice ที่ผสม L–tryptophan จำนวน 2 กรัมอยู่ด้วยแล้ว

นำปัสสาวะไปหาปริมาณ tryptophan metabolites สามชนิดที่ถูกกำจัดออกมาได้แก่ Kynurenine, 3–hydroxykynurenine และ Xanthurenic acid โดยวิธี Dowex $50H^+$ chromatography, elute ด้วย hydrochloric acid ส่วนระดับค่า plasma PALPนั้นทำโดยวิธี enzymatic assay ใช้ labeled L–tyrosine–1–^{14}C เป็น substrate มี tyrosine apodecarboxylase อยู่ด้วย คำนวณระดับค่า plasma PALP โดยเปรียบเทียบอัตราความเร็วของปฏิกิริยาระหว่าง plasma และ substrate mixture กับ standard curve ที่หาได้จากการเติมจำนวนPALP ที่ทราบค่าหลายค่าลงใน substrate mixture เลือดที่ใช้ draw จาก subject หลังจาก overnight fasting แล้วผลที่ได้พบว่าคนไข้ส่วนใหญ่มีปริมาณ metabolites ทั้งสามตัวในปัสสาวะสูงกว่าปกติอย่างน้อยหนึ่งชนิด คนไข้ ส่วนใหญ่มีระดับค่า plasma PALP ต่ำกว่าปกติ ยิ่งใน stage หลังๆ ของโรคปริมาณของ tryptophan metabolites ในปัสสาวะทั้งสามชนิดจะสูงมาก และระดับค่า plasma PALP ก็ต่ำมาก คนไข้ที่ได้รับ chemotherapy และอยู่ในระหว่าง complete remission จะมีระดับค่า plasma PALP กลับสู่ปกติ คนไข้ส่วนใหญ่มีปริมาณ metabolites ในปัสสาวะลดลงเป็นปกติ มีส่วนน้อยที่ยังมีปริมาณ single metabolite สูงกว่าปกติเล็กน้อย คนไข้ทุกคนได้รับการทำ skin test โดยใช้ histoplasma, purified protein derivative ของ tuberculin, mumps, และ C. albicans เป็น antigens และพบว่าคนไข้ใน stage แรกของโรค respond ต่อ skin test ได้ดีเท่าๆ คนปกติ ส่วนใน stage หลังๆ ของโรคมักจะเกิด anergy, คนไข้ที่มีระดับค่า plasma PALP ต่ำมักจะพบ anergy แต่คนไข้ที่มีระดับค่า plasma PAPL ปกติแทบทุกคน respond ต่อ skin test ดี.

จันจรี ศิริวิทยากร
B.Sc. (Med. Tech.)

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
BULLETIN OF CHIANG MAI MEDICAL TECHNOLOGY

Vol. 5 No. 1
January 1972

ข่าว

ฉลองครบรอบ 15 ปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้เริ่มก่อตั้งขึ้นเมื่อพุทธศักราช 2499 ด้วยเงินทุนรัฐบาลไทย และความช่วยเหลือของสหรัฐอเมริกา จวบจนกระทั่งถึงปัจจุบันนี้ เป็นเวลา 15 ปีเต็ม ทางคณะเทคนิคการแพทย์จึงได้จัดงานฉลองครบรอบ 15 ปีขึ้น ในวันที่1–5 พฤศจิกายน 2514 ณ ตึกเทคนิคการแพทย์ และในหอประชุมราชแพทยาลัย โรงพยาบาลศิริราช โดย

ก. การแสดงนิทรรศการเกี่ยวกับกิจกรรมของคณะฯ ซึ่งได้แก่

- การตรวจเลือดด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Autoanalyzer)
- การนับเม็ดเลือดขาวด้วยเครื่องมือพิเศษ
- การจำแนกสารโปรตีนในน้ำเหลืองโดยการทำ Electrophoresis
- วิธีการตรวจเลือดเพื่อให้พบเชื้อมาลาเรียได้ง่ายขึ้น
- การตรวจสมรรถภาพของตับโดยวิธีต่างๆ
- การตรวจการทำงานของไต
- การตรวจหาความผิดปกติของเม็ดเลือด
- การตรวจเพาะเชื้ออันเป็นสาเหตุของโรค

ข. การแสดงนิทรรศการเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ทางการแพทย์ โดยความเอื้อเฟื้อจากบริษัทต่าง ๆ โดยแสดง

- เครื่องตรวจอัตโนมัติ
- กล้องจุลทัศน์ชนิดต่าง ๆ ที่ทันสมัย
- สารเคมีสำเร็จรูป ที่ใช้ในการตรวจปัสสาวะ
- เครื่องคอมพิวเตอร์
- น้ำยาและสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้เกี่ยวกับการทดสอบ
- เครื่องพิเศษในการ ตรวจหา ระดับ สารต่างๆ ในเลือดและอื่น ๆ
- หนังสือต่าง ๆ ทางการแพทย์

ค. การประชุมวิชาการ และการอภิปราย

ซึ่งงานนี้ได้รับความสนใจจากแพทย์, เทคนิคการแพทย์ และประชาชนโดยทั่วไปเป็นอย่างดี และเป็นการเผยแพร่วิชาชีพเทคนิคการแพทย์ให้ เป็นที่ เข้าใจ แก่ประชาชนโดยทั่วไปอีกด้วย

กลับจากนอก

คุณมัลลิกา เมฆสุภะ เทคนิคการแพทย์ กรุงเทพฯ รุ่นที่ 10 กลับจากสหรัฐอเมริกาเดินทางมาถึงประเทศไทยเรียบร้อยแล้ว เมื่อวันที่ 9 พฤศจิกายน 2514 และคุณทัศนีย์ บริสุทธิ์ เทคนิคการแพทย์กรุงเทพฯ รุ่นที่ 11 จากที่เดียวกัน กลับมาถึงประเทศไทย เมื่อวันที่ 5 ธันวาคม 2514

คุณระดม องค์มหัทมงคล รังสีเทคนิครุ่นแรก กลับจากประเทศอังกฤษ ถึงประเทศไทย เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2514

สมรส

เทคนิคการแพทย์ ที่เข้าสู่พิธีมงคลสมรสเรียบร้อยแล้วในระยะนี้ คือ

คุณศิรินาถ เพ่งเรืองโรจนชัย เทคนิคการแพทย์กรุงเทพฯ รุ่น 10 แต่งกับคุณเอี่ยม อาทิกุลวงศ์ เทคนิคการแพทย์รุ่นที่ 8 เมื่อวันที่ 30 ตุลาคม 2514 ณ สหรัฐอเมริกา

คุณวิมล หล่อยนต์ เทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ แต่งกับ คุณเพียรศักดิ์ เมื่อวันที่ 16 ธันวาคม 2514 ณ นครหลวงกรุงเทพฯ - ธนบุรี

นิทรรศการเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

นิทรรศการเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ เป็นส่วนหนึ่ง ของนิทรรศการ ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่จัดแสดงในงานรื่นเริงฤดูหนาวของจังหวัดเชียงใหม่ ประจำปี 2514 โดยเริ่มงานตั้งแต่วันที่ 1–8 มกราคม 2515 ณ ตึกยิมเนเซี่ยม วิทยาลัยพละศึกษา ภายในสนามกีฬาเทศบาลนครเชียงใหม่ อันเป็นสถานที่จัดงาน

ในส่วนนิทรรศการเทคนิคการแพทย์นั้น แบ่งออกเป็นส่วนนิทรรศการ และส่วนบริการ

ส่วนนิทรรศการ ได้จัดการแสดง

- เครื่องมืออัตโนมัติต่างๆ ในห้องปฏิบัติการด้วยภาพถ่าย
- การเพาะเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค
- การแสดงเชื้อโรคสำคัญทางจุลชีววิทยาด้วยกล้องจุลทัศน์ เช่น เชื้อวัณโรค, อหิวาต์ เชื้อไข้เหลือง, เชื้อหนองใน เป็นต้น
- การแสดงสไลด์ภาพของผู้ป่วย ด้วยโรคซิฟิลิสและหนองใน
- การแสดงชนิดของพาราไซต์ที่สำคัญ
- การแสดงชนิดต่าง ๆ ของเม็ดเลือด

ส่วนบริการ จัดบริการพิเศษทั่วไปแก่ผู้สนใจ ได้แก่

- Blood group โดยรับตรวจหมู่เลือดให้แก่ประชาชนผู้สนใจ พร้อมทั้งออกบัตรแข็งถาวรให้เป็นบัตรประจำตัว ในบัตรที่ออกให้นี้ นอกจากจะแสดงกรุ๊ปเลือดแล้ว

ย้ามีบันทึกของโรคประจำตัว และยาที่แพ้อีกด้วย

- VDRL ตรวจหาผู้ป่วยด้วยซิฟิลิส
- Urine sugar โดยการตรวจหาน้ำตาลในปัสสาวะ
- Anemia ตรวจโลหิตจางโดยการตรวจหาฮิโมโกลบิน และฮิมาโตคริต
- Liver function test โดยตรวจหาระดับของสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของตับ ในน้ำเหลือง

ซึ่งทั้งนิทรรศการ และการบริการ ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางจากนักเรียน, นักศึกษา และประชาชนโดยทั่วไป อันเป็นการเผยแพร่วิชาชีพเทคนิคการแพทย์ ให้ เป็น ที่ เข้าใจและรู้จักของประชาชนในภูมิภาคแถบนี้ด้วย

สถิติ กรุ๊ปเลือด จากนิทรรศการเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่

จากการทำ Blood group ให้แก่ประชาชนที่มาเที่ยวงานฤดูหนาวเชียงใหม่ ตั้งแต่คืนวันที่ 1–8 มกราคม 2515 ได้สถิติของหมู่เลือดดังนี้

เลือดหมู่ เอ	700 คน
,, บี	932 คน
เลือดหมู่ AB	181 คน
เลือดหมู่ O	1160 คน
รวม	3073 คน

เฝ้าทูลละอองธุลีพระบาท

พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่ และสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าโปรดกระหม่อม ให้คณะคณาจารย์และนักศึกษามหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เข้าเฝ้าทูลละอองธุลีพระบาท เพื่อพระราชทานเลี้ยงเป็นการส่วนพระองค์ เมื่อวันที่ 11 มกราคม 2515 เวลา 15.00 น. ณ พระตำหนักภูพิงค์ราชนิเวศน์ ยังความปลื้มปีติให้แก่ผู้เข้าเฝ้าทูลละอองธุลีพระบาทเป็นล้นพ้น งานพระราชทานเลี้ยงและ เฝ้าทูลละอองธุลี พระบาท ยุติลง เมื่อ เวลา 18.30 น. มีผู้เข้าเฝ้าประมาณ 2000 คน

Good bye Bachelor

นักศึกษาเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ชั้นปีที่ 3 ได้จัดงานเลี้ยงแสดงความยินดีกับบัณฑิตเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่รุ่นที่ 3 และเลี้ยงส่งนักศึกษาเทคนิคการแพทย์รุ่นที่ 4 เมื่อวันที่ 13 มกราคม 2515 ณ ห้องอาหาร Rabbit ช้างเผือก มีผู้ไปร่วมงานคับคั่ง ทั้งอาจารย์, ข้าราชการ และนักศึกษา งานดำเนินไปด้วยความเรียบร้อย และยุติลงเมื่อเวลา 23 น.

พิธีพระราชทานปริญญาบัตร

พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว และสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ เสด็จพระราชดำเนินพระราชทานปริญญาดุษฎีบัณฑิตกิตติม-

ศักดิ์ และปริญญา แก่ผู้ทรงคุณวุฒิ และผู้สำเร็จการศึกษาประจำปีการศึกษา 2513–2514 ในสาขาวิชาต่าง ๆ ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ครั้งที่ 6 เมื่อวันศุกร์ที่ 14 มกราคม 2515 ณ ศาลาอ่างแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้ได้รับปริญญาดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์ คือ

พลเอกเนตร เขมะโยธิน ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์ (ศึกษาศาสตร์)

ศาสตราจารย์ ดร. บัวเรศ คำทอง ได้รับปริญญา วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต กิตติมศักดิ์ (เคมี)

พันตำรวจเอก นิรันดร ชัยนาม ได้รับปริญญาศิลปศาสตร์ดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์ (รัฐศาสตร์)

ผู้สำเร็จการศึกษาที่จะเข้ารับพระราชทานปริญญาบัตรครั้งนี้ รวมทั้งสิ้น 1072 คน คือ

บัณฑิตจากคณะเกษตรศาสตร์	101	คน
,, ,, แพทยศาสตร์	210	คน
,, ,, มนุษยศาสตร์	217	คน
,, ,, ศึกษาศาสตร์	162	คน
,, ,, สังคมศาสตร์	271	คน
,, ,, วิทยาศาสตร์	111	คน

สมาคม ฯ จัดประชุมใหญ่

สมาคมเทคนิคการแพทย์ แห่งประเทศไทย จัดประชุมใหญ่สามัญประจำปี 2515 ขึ้นในวันที่ 22 มกราคม 2515 ณ ห้องบรรยายตึกพยาธิวิทยา รพ. จุฬาฯ เวลา 11.00 น. และจะมีการเลือกตั้ง กรรมการ สมาคม ประจำปี 2515 ด้วย.