วารสาร เทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่

BULLETIN OF CHIANG MAI ASSOCIATED MEDICAL SCIENCES

VOLUME 11 SEPTEMBER 1978 NUMBER 3

17 OCT 1978
ห้องสมุดคณะเทคนิคการแพทย์

อินทรวิเชียรฉันท์

ผองเราระลึกหา พระบิดาผลิแพทย์ไทย
ทรงเห็น ณ ลาลไกล พระก็ตั้งฤทัยหมาย
ช่วยเหลือประชาราษฎร์ คลคลาคละความตาย
เจ็บป่วยกระวนวาย พระก็แจ้งฤทัยหมอง
แต่ก่อนสิเจ็บป่วย จะระรวยสุขสนอง
ญาติว่าปีศาจครอง จะดุร้ายมิหวั่นนลัว
หมอผีสิท่านเก่ง คณะเร่งระริกรัว
น้ำมนต์จะติดตัว และจะเสกกระบวนหวาย
หมอไล่ปีศาจพลัน มิฉะนั้นจะได้อาย
น้ำมนต์ผะสาดสาย และกระหน่ำมิปรานี
หวายเสกกระหน่ำซ้ำ ชะกำแหงรีลองดี
สาดซัดซะอีกที คนป่วยก็วายปราณ
อ้ากรมหลวงเจ้า พระก็เศร้าหทัยราน
เร่งรุดเพราะสงสาร คณะแพทย์พระก่อเกิด
การแพทย์ลุก้าวไกล ชนะภัยนะเป็นเลิศ
แพทย์ไทยก็บรรจิด โรคะร้ายมลายสูญ
เราแพทย์ธน้อยใหญ่ ประจุใจพระบุญคุณ
อีกทั้งพระการุณ บ่มิคลายจะจดจำ
สิ้นองค์พระทรงเดช บีตุเรศพระทรงธรรม
แพทย์คำริกระทำ อนุสาวรีย์แทน
อีกวันระลึกผล มหิดลมิคลอนแคลน
แพทย์ไทยจะหวงแหน ปฏิบัติระลึกคุณ

ชุมนุมวรรณศิลป คณะเทคนิคการแพทย์

ภาษาธรรมชาติ

ทดลองใช้ภาษาเขียนเพื่อสื่อสารกับมนุษย์ต่างดาว
ตลกไม่ออก ถ้าไม่ใช่ ม ม้าม้าม
ตอนนี้ผมเข้าใจแล้วว่าทำไม
ลูกศรพุ่งทะลุเป้าเพราะเล็ง
ผมจึงต้องเขียนบทความนี้
ดูทุกอย่างเป็นไปด้วยดี
ขอให้ทุกท่านมีความสุข
ถ้าเป็นคนที่ชอบเล่นกีฬา

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

FREE ERYTHROCYTE PORPHYRINS (FEP) IN NORMAL ADULTS AND THALASSEMIC CHILDREN

Boontham Siripipat, B.S. (M.T.)
Boonpayau Lauhachinda, B.S. (M.T.), M.S. (Clin. Path.)*
Panja Kulapongs, M.D.**

ABSTRACT

The level of free erythrocyte porphyrins (FEP) was determined by the micromethod of Piomelli in 46 normal adult males, 12 pregnant women and 31 children with homozygous beta-thalassemia and beta-thalassemia Hb.E. disease. The FEP level of 46.34 ± 16.00 (range 15.0-76.5) ug/100 ml red cells in normal adult males was similar to those recently observed by many investigators but slightly higher than those of older reports. This can be explained by the fact that with the present micromethod used the extraction of FEP is more efficient and complete than the older methods. The FEP level of 60 36 ± 16.28 (range 37.2-87.2) ug/100 ml red cells in pregnant women was significantly higher than normal adult male value ($p<0.01$) and can be explained on the basis of sex difference and the low transferrin saturation. The FEP level of 91.31 ± 51.13 (range 31.3-225.0) ug/100 ml red cells in 31 thalassemic children further indicated that in addition to the primary defect in globin chain synthesis the heme synthesis is also impaired.

Porphyrins are widely distributed in living cells and play essential roles in various metabolic processes such as photosynthesis, transportation of oxygen and cellular respiration. The most important porphyrin in human is

*Department of Clinical Chemistry Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

**Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences Chiang Mai University.

protoporphyrin 9, type III, which in combination with iron and specific proteins forms such compounds as hemoglobin, cytochrome, peroxidase and catalase. In red cells, in addition to those incorporated into heme small amount of protoporphyrin (less than 1 mole to 24,000 moles of heme) is found in apparently uncombined or free form (free erythrocyte protoporphyrin or FEP) along with smaller quantities of other porphyrins, primarily coproporphyrin [1, 2]. Since protoporphyrin is the last intermediate in the biosynthesis of heme increased concentration of FEP is found in various disorders in which the protoporphyrin is not efficiently utilized for heme synthesis, as in erythropoietic porphyrias [3], sideroblastic anemia [4], iron deficiency [1, 5-7], lead intoxication [6, 8-11], and anemia of chronic disorders such as chronic infection [12. 13] and rheumatoid arthritis [14, 15]. It seems likely, with the exception of primary disorder in porphyrin synthesis, that the common denominator of increased FEP was an iron supply or incorporation inadequate to meet the needs of the erythroid marrow.

The fundamental defect of thalassemia syndrome is the defective synthesis of globin chains. Nevertheless, accumulated evidences including an increased FEP [16] and the activity of heme enzyme delta-ALA dehydratase [17] in red cells, and the abnormally increased urinary excretion of PBG, coproporphyrin and dipyrroles [18, 19] strongly indicated that pyrrole metabolism and heme synthesis of thalassemic patients are also disturbed [20-23]. The conflicting results regarding the FEP levels in patients with thalassemia major and minor obtained by various investigators [16.20,24-26] can be partly explained by the differences in methodology and in the FEP values of control population. The conventional spectrophotometric methods [27,28] of determination of FEP involve exhaustive extraction with organic solvents and re-extraction from the solvent phase with hydrochloric acid which is not only time consuming but also requires large amount of blood sample. The micromethod recently described by Piomelli [11] is simple, rapid and the extraction of FEP is more efficient and complete than in other methods. With the aid of this technique, the status of FEP levels in our thalassemic children were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Heparinized venous blood samples were obtained from 46 healthy adult male, 12 pregnant women and 31 children with homozygous beta-thalassemia and beta-thalassemia Hb E disease. After a portion of plasma was separa-

ted the volume of packed red cells of each blood sample was determined by the standard microhematocrit technique.

The values of free erythrocyte porphyrins (FEP) were determined by the microfluorometric procedure of Piomelli[11] with slight modification. One tenth ml of the anticoagulated whole blood sample was transferred into a tube containing 5 ml of 5% celite suspension (in 0 9% NaCl) and mixed. After 5 ml of a 4:1 mixture of ethylacetate/acetic acid was added the tube was agitated vigorously on a vortex mixer for 60 seconds and centrifuged at 1,500 RPM for 3 minutes. The supernatant fluid was separated. Five ml of 1.5 N. HCl was added to the supernatant fluid and the tube was agitated on a vortex mixer for 60 seconds. An aliquot of the lower (colorless) HCl phase was transferred into a cuvette and the concentration of FEP was determined by reading the % emission in the fluorometer calibrated with a series of standard coproporphyrin I solutions. A blank is prepared in parallel by replacing the whole blood sample with 0.1 ml of saline solution. The final concentration of FEP was calculated from the formula:

$$\text{FEP ug/100 ml RBCs} = \frac{\text{FEP (ug/100 ml blood)}}{\text{Hct.}} \times 100$$

The standard solution of porphyrin (coproporphyrin I) was prepared by diluting the standard coproporphyrin I (5 ug/vial) with 2.5 ml of 0.1 N. HCl and heated for 5 minutes in boiling water. The serial dilutions were made from this stock solution (original concentration was 200 ug/100 ml). The example of standard calibration curve is shown in Figure 1.

RESULTS.

The results of our study are summarized in Table 1. The FEP value of 46.34 ± 16.0 ug/100 ml red cells in our normal adult males is similar to those recently found by the others[10, 11, 26, 29]. The FEP value of 60.36 ± 16.28 ug/100 ml red cells in pregnant women is significantly higher than normal adult male ($p < 0.01$). The FEP values of both male and female thalassemic children are definitely higher than normal adult value ($p < 0.001$). The difference between FEP values of these two groups of children is not statistically significant ($p > 0.05$). Figure III illustrated the individual value of FEP level in thalassemic children. The dotted lines represent the normal adult level (95% reliability).

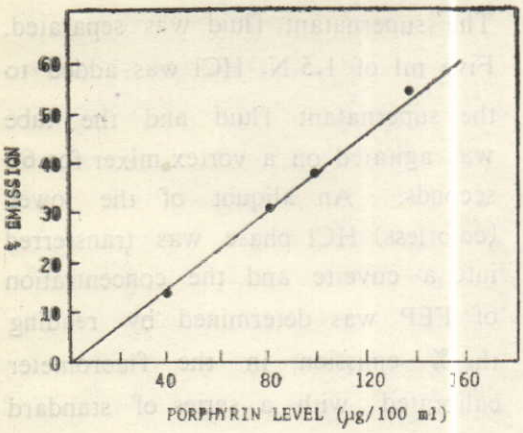


FIGURE I. STANDARD PORPHYRIN CALIBRATION CURVE.

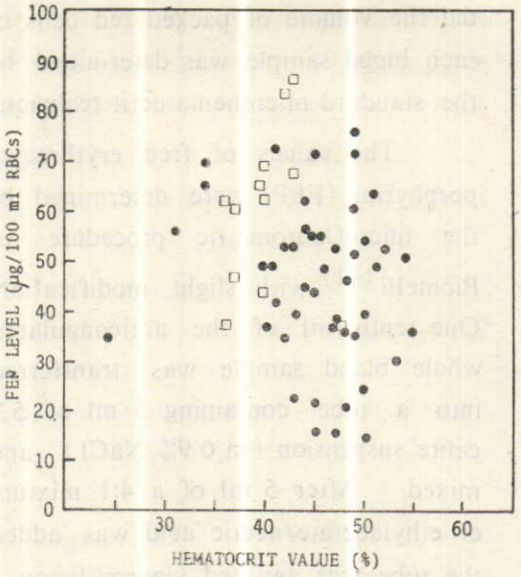


FIGURE II. FEP LEVELS IN NORMAL ADULT MALES (●) AND PREGNANT WOMEN (□).

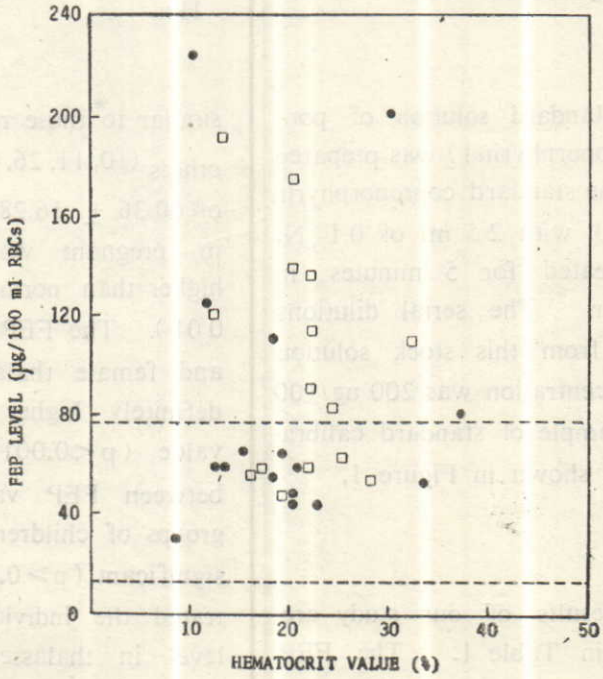


FIGURE III: FEP LEVELS IN MALE (●) AND FEMALE (□) BETA THALASSEMIA CHILDREN

Table 1. Values of Free Erythrocyte Porphyrins (FEP) in Thai Subjects.

SUBJECTS	No.	AGE yr.	HCT %	FEP ug/100 ml. RBCs
Normal Adult Males	46	23.4 ± 6.8	45.2 ± 5.9	46.34 ± 16.00 (15.0-76.5)
Pregnant Women	12	27.3 ± 12.6	40.0 ± 3.3	60.36 ± 16.28 (37.2-87.2)
Thalassemic Children	31	7.6 ± 3.6	20.1 ± 6.8	91.31 ± 51.13 (31.3-225.0)
: Male	16	8.1 ± 4.1	19.3 ± 8.2	83.34 ± 55.93 (31.3-225.0)
: Female	15	7.1 ± 3.8	20.9 ± 5.2	99.81 ± 45.83 (47.4-192.0)

Table 2. Values of Free Erythrocyte Porphyrins (FEP) in Thalassemic Subjects.

AUTHORS	No.	FEP ug/100 ml. RBCs	REFERENCE
THALASSMIA MINOR			
: Sturgeon et al (1955)	9	22 - 75	(24)
: Sturgeon et al (1958)	7	31	(25)
: Ludin (1962)	10	60 - 438	(20)
: Lyberatos et al (1972)	31	70.4 ± 22.19 (44-108)	(16)
: Stockman et al (1975)	29	38 ± 14 (11-72)	(26)
THALASSEMIA MAJOR			
: Schwartz-Tiene (1953)	10	96 - 168	(20)
: Sturgeon et al (1955)	7	19 - 110	(24)
: Sturegon et al (1958)	10	36	(25)
: Lyberatos et al (1972)	20	83.3 ± 23.42 (55-156)	(16)
: Present Study (1978)	31	91.31 ± 51.13 (31.3-225.0)	

DISCUSSION

Our mean FEP values in normal adult males is similar to those observed by many investigators [10,11,26,29] but somewhat higher than those found by the others [1]. Since there is no breakdown of heme to protoporphyrin occurred in this technique the possible explanation lies in the fact that the extraction of FEP by the very large solvent-erythrocyte ratio is more efficient and complete than in older methods. The higher FEP levels in pregnant women can be explained on the basis of sex difference [30] and most probably due to relative iron deficiency [1]. A portion of the normal protoporphyrin does appear to be related to iron deficiency state. In normal subjects, a significant correlation between transferrin saturation and protoporphyrin level is observed. The protoporphyrin level is somewhat higher with lower transferrin saturation. In pregnant women, the progressively decreased transferrin saturation results in accumulation of protoporphyrin in red cells because the nonavailability of iron prevents conversion of protoporphyrin 9 to heme [1].

The elevation of FEP level in beta-thalassemic red cells may be explained by the fact that although its primary defect involves the globin chain synthesis, there is impairment of heme synthesis as well. The synthesis of heme and globin are closely linked [31]. Defective globin synthesis results in a decreased heme synthesis through a feed back control mechanism [32] while the porphyrin synthetic enzyme delta-ALA dehydratase is increased [17]. The experimental study of porphyrin production indicated that when red cells or hemolysates are incubated in vitro free porphyrins tend to accumulated. Hemolysates of thalassemic red cells showed rapid incorporation of ALA into protoporphyrin indicating that the enzymatic steps between the two are intact [33]. Thalassemic hemolysates tended to accumulated a greater proportion of protoporphyrin than non-thalassemic hemolysates, suggesting a block in hemoglobin synthesis beyond the formation of protoporphyrin [21, 33, 34]. The question whether this is actually reflects incompleteness of hemoglobin synthesis or because of the preponderance of young cells in thalassemia has been raised [20]. It is now known that protoporphyrin exists within the red cell in a stable form, is not increased with a young population of cells and that reticulocytes per se do not have an increased protoporphyrin concentration [1]. Reports of the association between elevated protoporphyrin level and reticulocytosis [2, 35-39] can be explained by relative iron deficiency [1].

The acid-extracted porphyrins from red cell of normal individuals as well as those from the patients with primary porphyrias (erythropoietic protoporphyria or EPP) and secondary erythrocyte porphyrias (including lead intoxication, iron deficiency anemia etc.) are all chemically, physically, and spectrally identical to pure protoporphyrin-9 in acid aqueous solution (40). It has been incorrectly assumed that the natural state of the FEP in EPP and in other secondary porphyrias was identical. The detailed spectrofluorometric studies disclosed two distinct protoporphyrin species in this group of patients (40). The first species which is found in large quantities in red cells of patients with lead intoxication, iron deficiency anemia and chronic infection (and present in a very small amount in red cells of normal persons, patients with porphyria cutanea tarda and EPP) is the globin-bound zinc - protoporphyrin 9 (41). Acid-extraction of this protoporphyrin results in the loss of the chelated zinc from the protoporphyrin moiety. The resultant product exhibits spectral identity with the second species of protoporphyrin, metal-free protoporphyric as found in EPP patients. There are several other differences in the nature of these protoporphyrin species which are obscured by chemical changes occurring during extraction process. These differences may be part of the explanation for the difference in cutaneous photosensitivity between EPP, who are exquisitely light sensitive, and iron deficiency, lead intoxication and thalassemia patients who are not at all light sensitive.

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาปริมาณของ Free erythrocyte porphyrins (FEP) ในชายไทย หญิงตั้งครรภ์และเด็กที่ป่วยเป็นโรค thalassemia syndrome ด้วยวิธี microfluorometric technique ของ Piomelli ปรากฏว่าชายไทยมีสุขภาพสมบูรณ์ 46 คน มีระดับของ FEP ใกล้เคียงกับที่เคยมีผู้รายงานไว้หลายราย คือ 46 34 ± 16.0 (15.0–76.5) ug/dl red cells ค่าที่ได้นี้สูงกว่าการวัดด้วยวิธีเก่าเล็กน้อย เนื่องจากวิธีใหม่ที่ใช้นี้สามารถแยก FEP ออกมาจากเม็ดเลือดแดงได้ดีกว่าวิธีอื่น หญิงตั้งครรภ์ 12 คน มีระดับ FEP 60.30 ± 16.28 (37.2 - 87.2) ug/dl red cells ซึ่งสูงกว่าชายที่มีสุขภาพสมบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรค beta-thalassemia ทั้งชนิด homozygous และชนิดเกิดร่วมกับ Hb. E disease จำนวน 31 คน มีระดับ FEP สูงมากถึง 91.31 ± 51.13 (31.3-225.0) ug/dl. red cells ($p < 0.0001$) ซึ่งสนับสนุนว่าผู้ป่วยที่เป็น beta-thalassemia นั้นนอกจากจะมีความผิดปกติในการสร้าง globin chain แล้วยังมีความผิดปกติในการสร้าง heme ด้วย.

REFERENCES

1. Langer. E.E., Haining, R.G., Labbe R.F., Jacobs, P., Crosby, E.F., and Finch, C.A.: Erythrocyte protoporphyrin. Blood 40: 112, 1972.

2. Schwartz, S., Wikoff, H.M.: The relation of erythrocyte coproporphyrin and protoporphyrin to erythropoiesis. J. Biol. Chem. 194: 563, 1952.

3. Scholnick, P., Marver, H.S., and Schmid, R.: Erythropoietic protoporphyria: evidence for multiple sites of excess protoporphyrin formation. J. Clin. Invest 50: 203, 1971.

4. Kushner, J.P., Lee, G.P., Winthrobe, M.M., and Cartwright, G.E.: Idiopathic refractory sideroblastic anemia. Clinical and laboratory investigation of 17 patients and review of the literature. Medicine 50: 139, 1971.

5. Pagliardi, E., Prato, V., Giangrandi, E., and Fiorina, L.: Behaviour of the free erythrocyte protoporphyrin and of the erythrocyte copper in iron deficiency anemias. Brit. Haemat. 5: 217, 1959.

6. Lichtman, H.C., and Feldman, F.: In vitro pyrrole and porphyrin synthesis in lead poisoning and iron deficiency. J. Clin. Invest. 42: 830, 1963.

7. Dagg, J.H., Goldberg, A., and Lochhead, A.: Value of erythrocyte protoporphyrin in the diagnosis of latent iron deficiency. Brit. J. Haemat. 12: 326, 1966.

8. Kammholz, L.P., Thatcher, L.G., Blodgett, F.M., and Good, T.A.: Rapid protoporphyrin quantitation for detection of lead poisoning. Pediatrics 50: 625, 1972.

9. Piomelli, S., Davidow, B., Guinee, V.F., Young, P., and Gay G.: The FEP (free erythrocyte porphyrins) test: a screening method for lead poisoning. Pediatrics 51: 254, 1973.

10. Orfanos, A.P., Murphy, W.H. and Guthrie, R.: A simple fluorometric assay of protoporphyrin in erythrocyte (EPP) as a screening test for lead poisoning. J. Lab. Clin. Med. 89: 659, 1977.

11. Piomelli, S.: A micromethod for free erythrocyte porphyrins: the FEP test. J. Lab. Clin. Med. 81: 932, 1973.

12. Cartwright, G.E., Huguely, C.M. Jr., Ashenbrucker, H., Fay, J., and Winthrobe, M.M.: Studies on free erythrocyte protoporphyrin, plasma iron and plasma copper in normal and anemic subjects. Blood 3: 501, 1948.

13. Krammer, A., Cartwright, G.E., and Winthrobe, M.M.: The anemia of infection. XIX. Studies on free erythrocyte coproporphyrin

and protoporphyrin. Blood 9: 183, 1954.

14. Owen, E.T., and Lawson, A.A.H.: Nature of anaemia in rheumatoid arthritis. VI. Metabolism of endogenous iron. Ann. Rheum. Dis. 25: 547, 1966.

15. Gutniak, O., Kopec, M., and Nieczaj, J.: Porphyrin biosynthesis in the erythrocytes of patients with sideropenic anaemias. J. Clin. Path. 24: 336.1971.

16. Lyberatos, C., Chalevelakis, G., Platis, A., Stathakis, N., Panani, A., and Gardikas, C.: Erythrocyte content of free protoporphyrin in thalassemic syndrome. Acta Haemat. 47: 164, 1972.

17. Lyberatos, C., Mitsiou, C., Philippidou, A., Papayannis, A.G., Chalevelakis, G., and Gardikas, C.: Erythrocyte α-aminolevulinic acid dehydratase in homozygous B-thalassemia. Scand. J. Haemat. 12: 81, 1974.

18. Kreimer-Birnbaum, M., Pinkerton, P.H., Bannerman, R.M., and Hutchison, H.E.: Urinary "dipyrroles"; their occurrence and significance in thalassemia and other disorders. Blood 28:993, 1966.

19. Lyberatos, C., Papadopoulos, N., Papasteriadis, E., Mitsiou, C., Philippidou, A., and Gardikas, C.: Urine porphyrins and their precursors in homozygous B-thalassemia. Acta Haemat. 54:95, 1975.

20. Bannerman, R.M.; Abnormalities of heme and pyrrole metabolism in thalassemia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 119: 503, 1964

21. Feldman, F., and Lichtman, H.C: In vitro porphobilinogen and porphyrin synthesis in thalassemia major and sickle cell anemia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 119: 540 1964.

22. Steiner, M., Baldini, M., and Dameshek, W.: Enzymatic defects of heme synthesis in thalassemia. Ann. N.Y. Acad. Sci. 119: 548, 1964.

23. Vavra, J., and Kirchoff - Mayer, V.: In vitro porphyrin synthesis by human blood. Porphyrin synthesis by thalassemic erythrocytes. J. Lab. Clin. Med. 63:754, 1964.

24. Sturgeon, P., Itano, H.A., and Bergren, W.T.: Genetic and biochemical studies of intermediate types of Cooley's anemia. Brit. J. Haemat. 1:264, 1955.

25. Sturgeon, P., Chen, L., and Bergren, W.T.: Free erythrocyte porphyrins in thalassemia: preliminary observations. Proc. Sixth Congr. Intern. Soc. Hemat., 1958.

26. Stockman, J.A., III., Weiner, L.S., Simon, G.E., Stuart, M.J., and Oski, F.A.: The measurement of free erythrocyte porphyrin (FEP) as a simple means of distinguishing iron dificiency from beta-thalassemia trait in subjects with microcytosis. J. Lab. Clin. Med. 85: 113, 1975.

27. Schwartz, S., Berg, M. H., Bossenmeier, I., and Dinsmore, H.: Determination of protoporphyrin in biological materials. Meth. Biochem. Anal. 8: 221, 1960.

28. Wranne, L.: Free erythrocyte copro and protoporphyrin: methodological and clinical study. Acta Paediat. 49: (Suppl 124): 1, 1960.

29. Ward, E., and Mason, L.: Free erythrocyte protoporphyrin. J. Clin. Invest. 29. 905, 1950.

30. Watson, C.J.: The erythrocyte coproporphyrin. Variations in respect to erythrocyte protoporphyrin and reticulocytes in certain of the anemias. Arch. Intern. Med. 86: 797, 1950.

31. Rinington, C.: The biosynthesis of hemoglobin. Proc. Roy. Soc. Med. 51: 639, 1958.

32. Harris, J.W., and Kellermeyer, R.W.: The Red Cell. Harvard University Press, Cambridge, 1970. p. 210.

33. Vavra, J.D., Mayer, V.K.: In vitro porphyrin synthesis by human blood: porphyrin synthesis by thalassemic erythrocytes. J. Lab. Clin. Med. 63: 254, 1964.

34. Erlandson, M.E., Wehman, J., Stern, G., Hilgartner, M, and Smith, C.H.: Heme synthesis in thalassemia: defect in conversion of glycine to d-aminolevulinic acid. Am. J. Dis. Child. 102:590, 1961.

35. Watson, C.J., and Clarke, W.O.: The occurrence of protoporphyrin in the reticulocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 36:65, 1937.

36. Watson C.J., Grinstein, M., and Hawkinson, V.: Studies of protoporphyrin. IV. A comparison of the erythrocyte protoporphyrin concentration with the reticulocyte percentage under experimental and clinical conditions. J. Clin. Invest. 23: 69, 1944.

37. Grinstein, M., Silva, J.A., and Winthrobe, M.M.: The anemia in infection VI. The significance of free erythrocyte protoporphyrin, together with some observation on the meaning of the "easily split-off" iron. J. Clin. Invest. 27: 245, 1948.

38. Eriksen, L: So-called free erythrocyte protoporphyrin and its possible role in hemoglobin formation. Acta Physiol. Scand. 53: 288, 1961.

39. Prato, V., and Mazza, U.: Some aspects of porphyrin metabolism in thalassemia. Panminerva Med. 4: 344, 1962.

40. Poh-Fitzpatrick, M.B., and Lamola, A.A.: Direct spectrofluorometry of diluted erythrocytes and plasma: a rapid diagnostic method in primary and secondary porphyrinemias. J. Lab. Clin. Med. 87: 362, 1976.

41. Lamola, A.A., and Yamane, T.: Zinc-protoporphyrin in the erythrocytes of patients with lead intoxication and iron deficiency anemia. Science 186:936, 1974.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

THE EVALUATION OF THE HEMOCULTURE PROCEDURES IN NAKORN CHIANG MAI HOSPITAL LABORATORY

เพ็ญประภา จันทร์บรรเจิด วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
สุชาติ ศิริทูล วท.ม. (จุลชีววิทยา)*

บทคัดย่อ

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย จำนวน 172 ตัวอย่างที่ส่งมาจากแผนกอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ นำมาทำ hemoculture โดยวิธี routine subculture bottle (RB) และ control bottle (CB) system พบว่า RB ให้ผลที่ Sensitive มากกว่า CB system 4.07% ในขณะเดียวกัน ตัวอย่างเลือด 167 ตัวอย่างจากแหล่งเดียวกัน นำมาทำ hemoculture แบบ routine subculture test tube (RT) system ก็ให้ผลที่ sensitive มากกว่า control test tube (CT) system ด้วย 1.2%. จากการเปรียบเทียบ sensitivity ของการใช้เลือด ตัวอย่าง 5 ml. (RB) และ 1 ml. (RT) โดยที่ให้อัตราส่วนของเลือดต่อ broth 1:10 คงเดิม ในการทำ hemoculture พบว่า RB มีแนวโน้มที่จะให้ผล sensitivity มากกว่า RT 5.13% แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เพราะพบว่าในบางราย (0.87%) RT ให้ผลที่ Sensitive ดีกว่า CB จึงควรมีการทดลองต่อไป.

บทนำ

เลือดของคนปกติจะอยู่ในลักษณะที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด ดังนั้นเลือดที่มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ จึงเป็นเครื่องชี้ให้เห็นถึงภาวะที่ผิดปกติ หรือภาวะที่เป็นโรค การที่เลือดมีเชื้ออยู่นั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากผู้ป่วยมี traumatic and surgical wounds, as well as from burns, injury to bones and joints, brain abscesses, furunculosis, cellulitis, meningitis, Pneumonia, lung abscesses, empyema, mucoviscidosis, mycotic aneurysm, cardiac anomalies, peritonitis, intestinal or biliary

* ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

obstruction, cholangitis, carcinoma, urinary obstruction, nephropathies, post partum endometritis and septic abortion.[1]. เป็นต้น ซึ่งการที่ผู้ป่วยมีเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิต จะมีผลทำให้เกิด Septicemia โลหิตเป็นพิษ และตายในที่สุดได้, ฉะนั้นการทำ blood หรือ Hemoculture จึงเป็นประโยชน์ในด้านการหาสาเหตุของโรคเพื่อการรักษา และติดตามผลของการรักษา วิธีการแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของ Septicemia ให้ได้โดยทันทีและแม่นยำเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุด[1] ดังนั้นการทดลองนี้จึงสนใจวิธีการ การทำ Hemoculture โดยมีวัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบวิธีการทำ hemoculture แบบวิธี subculture system และ control system ในด้าน contamination และ Sensitivity ของวิธีการทั้ง 2 แบบ

2. เปรียบเทียบ sensitivity ของการการเจริญของเชื้อเมื่อใช้จำนวนเลือดในการทำ culture 5 ml และ 1 ml ในอัตราส่วนของเลือดต่ออาหารเลี้ยงเชื้อคงเดิม

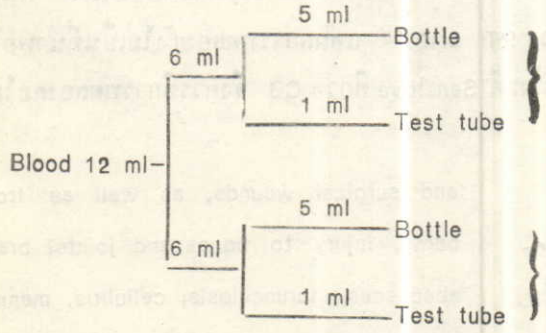
วัตถุและวิธีการ

1. สิ่งส่งตรวจ เลือดเจาะจากผู้ป่วยของแผนกอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่

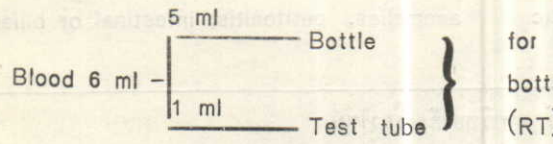
2. อาหารเพาะเชื้อ broth ที่ใช้เป็น Brain Heart Infusion broth (BHI) (Difco) prepared according to the manufacturer's instruction บรรจุในขวด 45 ml. และใน test tube 1 ml.

3. Blood Collection การเจาะเก็บเลือดทำวิธีการใดวิธีการหนึ่ง ใน 2 วิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 เจาะเลือด 12 ml ใส่ลงในขวดหรือหลอดแก้วดังนี้



วิธีการที่ 2 เจาะเลือด 6 ml



การทดลอง

Subculture system

Day	Blood in Brain Heart Infusion broth (1:10)
1	All incubate at 37°C
2	All streak on chocolate agar plate incubate at 37°C (10%CO_2) and check turbidity and reincubate
3	Check turbidity Check chocolate agar identify and antibiotic sensitivity test
4	Check turbidity Report organism and antibiotic sensitivity
5	Check turbidity
6	Check turbidity All streak on chocolate agar plate as day 2nd.
7	Report :– No growth in 7 days.

วันที่ 1 incubate ขวดและหลอดแก้ว hemoculture ไว้ตลอดคืนที่ 37°c

วันที่ 2 subculture broth จากขวดและหลอดแก้วลงใน chocolate agar plate, incubate ไว้ที่ 37°c ในบรรยากาศของ 10% CO_2 ตลอดคืน ถ้ามีขวดหรือหลอดแก้วที่ขุ่นก็ทำการย้อมด้วยวิธี gram stain ถ้าพบเชื้อก็รายงานผลเป็น preliminary report ว่าพบเชื้อพวกใด. ขวดและหลอดแก้วทั้งหมด Reincubate ต่อไปดังเดิม

วันที่ 3 อ่าน chocolate agar plate ถ้าพบว่ามีเชื้อขึ้นก็ identify และทำ antibiotic sensitivity test และรายงานผลในวันรุ่งขึ้น ส่วนขวดหรือหลอดแก้วที่ยังไม่มีเชื้อขึ้น ก็สังเกตดูความขุ่น ถ้าขุ่นก็ Subculture ลงใน chocotate agar plate ถ้าไม่ขุ่นก็ reincubate ต่อไป

วันที่ 4 สังเกตดูความขุ่นของ broth ถ้าขุ่นก็ subculture ดังกล่าวแล้ว ถ้ายังไม่ขุ่นก็ reineubate ต่อไป

วันที่ 5 เช่นเดียวกับวันที่ 4

วันที่ 6 subculture broth ลงใน chocolate agar แล้ว incubate ที่ 37°c ในบรรยายกาศ 10% CO_2 ตลอดคืน

วันที่ 7 อ่าน Chocolate agar plate ถ้ามีเชื้อขึ้นก็ identify และทำ antibiotic sensitivity test และรายงานผลในวันรุ่งขึ้น ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นก็รายงานผลว่า "No growth in 7 days"

หมายเหตุ ขวดหรือ tube รายใดก็ตามที่รายงานโดยสมบูรณ์ออกไปแล้ว ให้คัดทิ้งไปได้เลย ไม่ต้อง Reincubate ต่อไป

Control system

Incubate ขวดและหลอดแก้ว hemoculture ไว้ที่ 37°C สังเกตดูความขุ่นทุกวัน ถ้าพบวันใดมีความขุ่นเกิดขึ้นก็ทำการย้อม และ subculture ลงใน chocolate agar plate, incubate 37°C ในบรรยากาศ 10%CO_2 ตลอดคืน ถ้ามีเชื้อขึ้น ก็ทำการ identify และ antibiotic sensitivity test และรายงานผลต่อไป ถ้าไม่มีเชื้อขึ้น ก็ reincubate culture ทั้งหมดต่อไป จนถึงวันที่ 6 จึง subculture broth ทั้งหมดลงบน chocolate agar plate ถ้ามีเชื้อขึ้นในวันรุ่งขึ้นก็ทดลองต่อไปดังกล่าวแล้ว แต่ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นก็รายงานผลว่า "No growth in 7 days"

Table 1 Comparison of number of specimens that have found organisms obtained with routine subculture bottle (RB) and control bottle (CB) system, routine subculture test tube (RT) and control test tube (CT) system.

RB	CB	Number of Specimens	%
−	−	152	88.37
+	+	13	7.56
+	−	7	4.07
−	+	0	0
Total		172	100.00

RT	CT	Number of Specimens	%
−	−	157	94.01
+	+	8	4.79
+	−	2	1.20
−	+	0	0
Total		167	100.00

ผลการทดลอง

ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยแผนกอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ที่เจาะใส่ขวด และหลอดแก้วเพื่อทำ hemoculture แบบ routine subculture bottle (RB), control bottle (CB), routine subculture test tube (RT), และ control test tube (CT) system พบว่า ในจำนวนเลือด 172 ตัวอย่าง ที่ทั้ง RB และ CB ไม่พบเชื้อขึ้นเลยมีจำนวน 152 ตัวอย่าง (88.37%), ที่ทั้ง RB และ CB พบเชื้อขึ้นและเป็นชนิดเดียวกันมี 13 ตัวอย่าง (7.56%), RB พบเชื้อขึ้นแต่ CB ไม่พบเชื้อมี 7 ตัวอย่าง

Table 2 Recovery of organisms have been found in type RB positive but CB negative, and RT positive but CT negative

Type	Patient No	Specimen No.	Organisms
RB + ve CB − ve	I	1	Pneumococci
		2	No growth
		3	Pneumococci
	II	1	No growth
		2	No growth
		3	Salmonella group C1
	III	1	Acinetobacter anitratum
		2	No growth
		3	Acinetobacter anitratum
	IV	1	Escherichia coli
		2	Both RB and CB positive for E coli
		3	Both RB and CB positive for E.coli
	V	1	No growth
		2	No growth
		3	Staphylococcus aureus coag−ve
RT + ve CT − ve	I	1	Both RT and CT positive for Klebsiella pneumoniae
		2	Klebsiella pneumoniae
		3	Klebsiella pneumoniae

Table 3 Results showing number of specimens and percentage that have found organisms in routine subculture bottle (RB) and routine subculture test tube (RT) system from 575 samples.

RB−ve RT−ve		RB − ve RT + ve		RB + ve RT − ve		RB − ve RT + ve		Total RB + ve		Total RT + ve	
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
507	88.17	50	8.70	18	3.13	5	0.87	68	11.83	55	9.56

(4.07%) และที่ RB ไม่มีเชื้อขึ้นแต่ CB พบเชื้อขึ้นนั้น ปรากฏว่าไม่มีในทำนองเดียวกัน จำนวนเลือด 167 ตัวอย่าง ที่ทั้ง RT และ CT Negative มี 157 ตัวอย่าง (94.01%), ทั้ง RT และ CT positive มี 8 ตัวอย่าง (4.79%) ส่วนที่พบเชื้อเฉพาะใน RT มี 2 ตัวอย่าง (1.20%) และที่พบเชื้อเฉพาะใน CT อย่างเดียวพบว่าไม่มีเลย (ตารางที่ 1)

ชนิดของเชื้อที่พบใน RB แต่ไม่พบใน CB และที่พบใน RT แต่ไม่พบใน CT แสดงไว้ในตารางที่ 2

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบ sensitivity ของการใช้เลือด 5 ml (RB) และ 1 ml (RT) ในอัตราส่วนของเลือดและ broth ยังคงเป็น 1:10 พบว่าในจำนวน sample 575 ตัวอย่าง ทั้ง RB และ RT ไม่พบเชื้อขึ้นเลย 507 ตัวอย่าง (88.17%) พบเชื้อเฉพาะใน RB แต่ไม่พบใน RT มี 18 ตัวอย่าง (3.13%), พบเชื้อเฉพาะใน RT แต่ไม่พบใน RB 5 ตัวอย่าง (0.87%) และที่พบเชื้อทั้งใน RB และ RT 50 ตัวอย่าง (8.70%), รวมพบเชื้อใน RB ทั้งหมด 68 ตัวอย่าง (11.83%) และ RT ทั้งหมด 55 ตัวอย่าง (9.56%) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบวิธีการทำ hemoculture โดย routine subculture bottle (RB) และ Control bottle (CB) system ปรากฏผลว่า RB พบเชื้อมากกว่า CB 4.07% ดังตารางที่ 1 แต่มีปัญหาอยู่ว่า การพบเชื้อของ RB ที่สูงกว่า CB system ถึง 4.07% นี้ จะเป็น contamination ในระหว่างการทดลองหรือไม่? จากตารางที่ 2 ซึ่งแสดงชนิดของเชื้อที่พบใน RB แต่ไม่พบใน CB 4.07% ดังกล่าวแล้ว จะเห็นว่าในคนไข้ No. I และ II เชื้อที่พบเป็น Pneumococci และ Salmonella group C_1 ซึ่งไม่ใช่ contaminant organism ในคนไข้ No. III พบเชื้อ Acinetobacter anitratum ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถ contaminate ในระหว่างการทดลองได้ แต่จากการพบถึง 2 Specimens ในจำนวน 3 Specimens ย่อมยืนยันได้ว่า เชื้อ

ตัวนี้ไม่ใช่ contamination ในระหว่างการทดลองในผู้ป่วย No. IV พบเป็นเชื้อ E. coli ใน Specimens ที่ 1 และใน Specimens ที่ 2 และ 3 ก็พบเชื้ออย่างเดียวกันทั้งใน RB และ CB ปัญหา contamination ก็หมดไป แต่ในผู้ป่วย No. V พบเชื้อ Staphyllococcus aureus coagulase - ve ใน Specimen ที่ 3 ในขณะที่ Specimens ที่ 1 และที่ 2 ให้ผล No growth ทั้งใน RB และ CB จึงเป็นปัญหาอยู่ว่าเชื้ออาจเป็น contaminant organism ก็ได้ (2,3) แต่อย่างไรก็ตาม โดยสรุปแล้วจากการทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อส่วนใหญ่หรือทั้งหมดไม่ได้ contaminate ในระหว่างการทดลองดังนั้น การที่พบว่า RB ให้จำนวนการพบเชื้อได้สูงกว่า CB system จึงอาจกล่าวได้ว่า RB sensitive ดีกว่า CB system และปัญหา contamination เกือบจะไม่เกิดขึ้นเลย ในการทำแบบ RB system ในทำนองเดียวกันจากผลการทดลองใน Routine subculture test tube (RT) และ control test tube (CT) system (ตารางที่ 1) ก็ให้ผลสนับสนุนคำวิจารณ์ดังกล่าวข้างต้นนี้ด้วย. การที่ RB ให้ sensitivity ที่ดีกว่า CB นั้น อาจเนื่องมาจากเชื้อบางชนิดเจริญช้าและไม่แสดงความขุ่นในการเจริญ การ subculture ลงบน Solid media จะช่วยให้เชื้อมีโอกาสเจริญให้เห็นได้ (4) เชื้อบางชนิดเช่น Pneumococci จะเกิด Autolysis ได้ง่าย ดังนั้นจึงตายได้ง่ายและไม่แสดงความขุ่น ใน broth ในผู้ป่วยบางรายที่ได้รับยาปฏิชีวนะสารทำให้มีการทำลายผนังเซลของตัวเชื้อ หากไม่มีการ subculture ลงบน solid media เชื้อก็อาจตายไปได้ทำให้ไม่มีความขุ่นเกิดขึ้นใน broth (4) และในกรณีที่เลือดเกิดแข็งตัว จับ กัน เป็น ก้อนใน broth เชื้ออาจถูกจับเข้าไว้ในก้อนเลือดนั้นทำให้ไม่มีโอกาสเจริญได้ แต่ถ้ามีการทำ subculture ย่อมมีการเขย่าขวด โอกาสที่เชื้อจะหลุดออกมาจากก้อนเลือดย่อมมีได้มากกว่า(5)

ในการทดลองเปรียบเทียบ sensitivity ของการพบเชื้อ เมื่อใช้เลือด 5 ml. (RB) กับ 1 ml. (RT) โดยอัตราส่วนของเลือดต่อ broth เป็น 1:10 คงเดิม พบว่า RB ให้ผลในการพบเชื้อมากกว่า RT 3.13% ซึ่งมีแนวโน้มที่ว่า RB น่าจะ sensitive ได้ดีกว่า RT และมีทางเป็นไปได้มาก เพราะปริมาณเลือดที่ใช้น้อยลงอาจทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อลดลงไปด้วย (1) แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปดังความเห็นข้างต้นนี้ได้ เพราะในการทดลองยังพบด้วยว่า ในบางราย (5 ราย) RT จะให้ผล positiva ได้มากกว่า RB 0.87% และเชื้อที่พบเป็น Pnuemococci ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าไม่ใช่ contamination และการพบเช่นนี้ ผู้ทดลองยังหาเหตุผลที่จะใช้วิจารณ์ไม่ได้ว่าทำไมถึงเป็นเช่นนั้น แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ไม่หวังที่จะให้ได้ผลว่า RT ควรมี sensitivity ที่ดีกว่า RB แต่หวังไว้ว่า RT ควรจะมี sensitivity ของการพบเชื้อได้เท่า หรือเกือบเท่า RB ก็เป็นที่น่าพอใจแล้ว เพราะจะเป็นประโยชน์ในการเจาะ เก็บเลือดจากผู้ป่วยซึ่งบางครั้งเจาะยากและได้ไม่เพียงพอกับจำนวนที่ต้องการ โดยเฉพาะในรายที่ต้องเจาะเลือดจำนวนมากเพื่อใช้ทดสอบในด้านอื่น ๆ ด้วย เช่นทาง Chemistry และ Serology เป็นต้น.

Abstract

The blood sample from 172 patients at Chiang Mai Hospital were collected in steriled Brain Heart Infusion broth by Routine Subculture Bottles (RB) System and by Control Bottles (CB) system. It was found that RB system gave more sensitivity than CB system 4.07%. At the same time, 167 blood samples were collected by Routine Subculture Test Tube (RT) System and also the results from this systeme gave more sensitivity than that of Control Test Tube (CT) system only for 1,2%. In comparison of the using of volume of blood samples for hemoculture, 5 ml (RB) and 1 ml (RT), RB was tended to give better sensitivity than RT. However, the resulta are still unsatisfied.

REFERENCES

1. Lennette, E.H., E.H., Spanlaling, and J,P. Traunt (Editors), Manual of clinical microbiology. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C., P 55 - 62, 1974.
2. Conner, V, and O.T. Mallery. Blood culture: a clinical laboratory study of two method. Am, J. Clin Pathol. 21:785–788, 1951.
3. Ellner, P,D. System for inoculation of blood in the laboratory. Appl. Microbiol, 16:1892–1894,1968.
4. J.G. Collee, B.I. Duerden, and R. Brown. Recovery of anaerobic bacteria fram small inocula: a model for blood culture studies. J. Clin. Pathol. 57:220–227, 1977.
5. Rosner, R. A quantitative evaluation of thrne blood culture systems. J. Clin. Pathol. 57:220–227, 1972.

วารสารเภสัชกรรมแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

COMPARISON OF PERCENTAGE OF T-LYMPHOCYTE WITH NUMBER OF LYMPHOCYTE IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD OBTAINED BY TWO DIFFERENT METHODS; DEXTRAN FLOATATION AND FICOLL-HYPAQUE SEPARATION TECHNIQUE

Pakorn Thaiyanan M.Sc.*
Vicharn Vithayasai, M.D., Ph.D.**

ABSTRACT

The present paper described a technique for isolation of lymphocyte from 12 ml whole blood by the methods of dextran floatation and Ficoll-Hypaque separation. When dextran was used as a separating agent the whole blood cells were separated into two parts, the lower part was almost red cells and some leukocytes and platelets. The upper part was white blood cell-rich plasma. The total white blood cell count were $28.0 \times 106 \pm 6.06 \times 10^6$ cells/ml which were $16.25 \times 10^6 \pm 6.43 \times 10^6$ cells/ml of mononuclear cells and contained $64.21 \pm 10.04\%$ T-rosettes. With Ficoll-Hypaque separation, the blood was separated into two fractions. The bottom fraction contained erythrocyte and granulocyte. The white band, upper fraction, contained total mononuclear cells of $11.25 \times 10^6 \pm 2.09 \times 10^6$ cells/ml from total white blood cell count of $12.0 \times 10^6 \pm 2.21 \times 10^6$ cells/ml and 65.06 + 8.83% T-rosettes.

The number of lymphocyte obtained from dextran floatation was more higher than from Ficoll-Hypaque separation. However, the percentage of T-lymphocyte per white blood cell count by dextran floatation was lower and more leukocyte, platelet contamination when compared with Ficoll-Hypaque separation.

The ratio of T-lymphocyte and B-lymphocyte has been reported but varying in the results depend on the methods used to separate or identify them. There were many methods used for separating lymphocyte from the peripheral blood such as 3% gelatin, glass wool filtration, bouyanted

* Department of Clinical Immunology, Faculty of Associated Medical Sciences
** Department of Microbiology, Faculty of Medicine.

density gradient centrifugation and Ficoll - Hypaque [1,2,3,4 6,7]. This study is therefore initiated for the comparison of yield human peripheral blood lymphocyte separated by dextran floatation and Ficoll-Hypaque separation technique. The percentage of the T-lymphocyte prepared by those two technique was identified by rosette-formation.

MATERIALS AND METHODS

Twelve mililiters of blood was drawn from normal volunteers. The blood was divided into two 6 ml portions; one portion was mixed well with 0.6 ml of 6% dextran solution with 0.6 ml of 500 IU heparin and kept vertically in 37°C incubator for 40 - 50 minutes to allow red cell sedimentation. The leukocyte-rich plasma, upper layer, was collected. The other portion was mixed well with 18 ml of normal saline with 0.6 ml of 500 IU heparin and overlayered on Ficoll-Hypaque mixture (4.8 ml of 9% Ficoll+ 2 ml of 34% Hypaque). The mixture was centrifuged at 1000 rpm (400g) for 40 minutes. The white opaque layer between the plasma and Ficoll-Hypaque layers was collected. The cells obtained from those two methods were washed three times with buffered saline solution (BSS), pH 7.4, and both were resuspended with 1 ml of Hank's solution. The cells were then counted, so called total white blood cell count. The cell suspension was diluted to $5x10^6$ cells/ml with Hank's solution.

The T-rosette was determined by mixing 0.2 ml of the adjusted lymphocyte suspension with 0.2 ml of 5% sheep red blood cell suspension in Hank's solution. The mixture was incubated at 37°C in a waterbath for 15 minutes and then centrifuged at 200g for 5 minutes and reincubated overnight at 4°C. The supernatant fluid was removed and the cell pellet was resuspended gently with 0.2 ml of Hank's solntion. One drop of the cell suspension was placed on slide and mixed with one drop of fetal calf serum (or AB serum), as a fixing agent. Using a second slide smeared forward until nearly to the terminal end of the first slide, tilted the smear slide backward to allow the mixture to flow backward and kept the smear dry at room temperature. The smear was fixed by flaming for 2-3 seconds before staining with Wright's stain. Five hundred lymphocytes was counted, those cells bound more than three sheep red cells was considered to be rosette forming cells or T-lymphocytes. The percentage of rosette forming T-lymphocyte was then calculated. A differential leukocyte counting was also performed on each specimen.

RESULTS

The separation lymphocyte from red blood cell by dextran floatation, the blood cells were separated into two portions after standing for 40-50 minutes. The upper portion was granulocyte - rich plasma containing mainly lymphocyte, granulocytes, platelets, and lower portion was mainly red blood cells with some leukocytes and platelets.

By Ficoll - Hypaque separation, the blood cells were separated into two fractions after centrifugation. A white layer appeared at the interface region containing of mononuclear cells and a small number of platelets and a bottom fraction containing erythrocytes and granulocytes. The plasma layer, upper layer, was clear and contained no cells.

In this study of 10 normal adult volunteers with the age of 20-30 years, the yield of lymphocytes when separated by dextran floatation were $16.25 \times 10^6 \pm 6.43 \times 10^6$ cells/ml (range 8.6×10^6-25.6×10^6 cells/ml) from the total white blood cell count of $28.0 \times 10^6 \pm 6.06 \times 10^6$ cells/ml (range 15.3×10^6-34.2×10^6 cells/ml), the differential counts were 57.8 ± 16.78% mononuclear cells, 41.1 ± 17.62% neutrophils and 2.7 ± 2.16% eosinophils and 64.2 ± 10.04% T-rosettes (range 40.1-74.2). The lymphocytes obtained by Ficoll-Hypaque separation were $11.25 \times 10^6 \pm 2.09 \times 10^6$ cells/ml (range 7.5×10^6-13.8×10^6 cells /ml) from the total white blood cell count of $12.0 \times 10^6 \pm 2.21 \times 10^6$ cells/ml (range 7.7×10^6 - 14.3×10^6 cells/ml), differential counts were 95.8 ± 2.25% mononuclear cells (range 93-100), 4.1 ± 2.28% neutrophils (range 0-7%), 0.1 ± 0.31% eosinophils (range 0-1%) and 65.06 ± 8.83% T-rosettes (range 49.8 - 74.6%). The total white blood cells and mononuclear cells counts by dextran were more than by Ficoll Hypaque, a significant difference, $p < 0.05$, respectively. The percentage of the mononuclear cells differential count from both methods were also significantly different $p < 0.001$, but the percentages of T-rosette were not different.

Table: Comparison of the yield of white blood cell and %T-lymphocyte by two methods

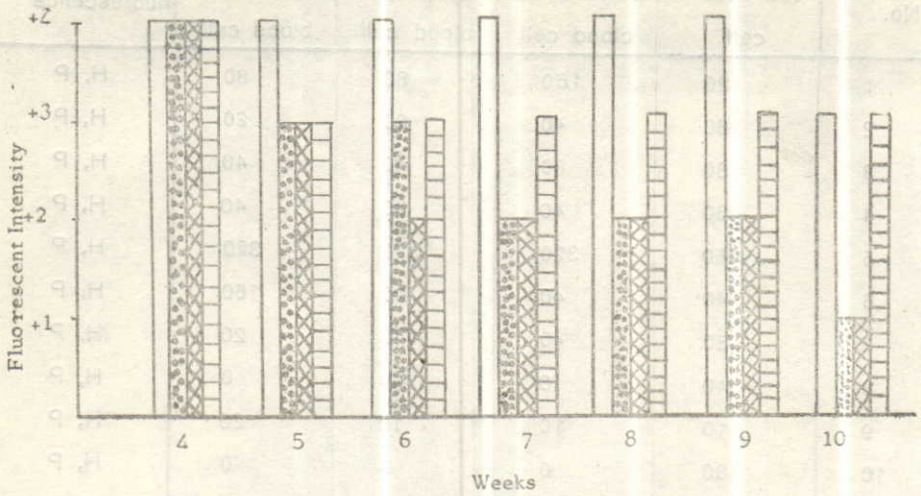
	Dextran							Ficoll-Hypaque						
No.	Total WBC count ($x10^6$/ml)	Differential count				Total M ($x10^6$/ml)	% T-cell	Total WBC count ($x10^6$/ml)	Differential count				Total M ($x10^6$/ml)	% T-cell
		M	N	E	B				M	N	E	B		
1	21.8	79	21	-	-	17.2	40.1	10.4	95	5	-	-	9.9	49.8
2	25.8	45	52	3	-	11.6	69.6	10.9	93	7	-	-	10.1	69.0
3	34.2	82	15	3	-	28.0	74.2	14.1	98	2	-	-	13.8	74.6
4	28.0	61	33	6	-	17.1	72.0	10.2	96	3	1	-	9.8	67.6
5	25.9	35	63	2	-	9.1	69.6	11.4	100	-	-	-	11.4	70.4
6	15.3	57	43	-	-	8.7	64.6	7.7	97	3	-	-	7.5	65.0
7	33.2	77	23	-	-	25.6	66.6	14.0	97	3	-	-	13.6	74.6
8	33.1	39	57	4	-	12.9	68.0	13.3	94	6	-	-	12.5	67.0
9	29.4	50	46	4	-	14.7	62.4	13.7	93	7	-	-	12.7	62.6
10	33.3	53	42	5	-	17.6	55.0	14.3	95	5	-	-	13.6	50.0
Mean	28.0	58	41	3	-	16.3	64.2	12.0	96	4	0.1	-	11.3	65.1
S.D.	6.1	17	18	2	-	6.4	10.0	2.2	2.3	2	0.3	-	2.1	8.8
S.E.	1.9	5	6	1	-	2.0	3.2	0.7	1	1	0.1	-	0.7	2.8

M = mononuclear cell N = neutrophil B = basophil E = eosinophil

Table : Comparison of antinuclear antibody titer obtaining from each substrate

Serum No.	Antinuclear antibody titer				pattern of fluorescence
	rat liver cell	chicken red blood cell	goose red blood cell	human white blood cell	
1	20	160	80	80	H, P
2	160	40	20	20	H, P
3	80	80	40	40	H, P
4	160	40	40	40	H, P
5	160	320	320	320	H, P
6	40	40	40	160	H, P
7	80	40	40	20	H, P
8	40	0	0	0	H, P
9	10	10	10	20	H, P
10	80	0	0	0	H, P
11	80	80	40	20	H
12	160	160	160	20	H
13	80	160	160	40	H
14	40	0	0	0	H, S
15	80	0	0	0	H, S
16	80	0	0	0	H, S
17	20	0	0	0	H, S
18	80	0	0	0	S
19	10	0	0	0	S
20	320	0	0	0	S
21	20	0	0	0	S
22	640	0	0	0	S
23	640	0	0	0	S
24	640	0	0	0	S
25	320	0	0	0	S
26	160	0	0	0	S
27	160	0	0	0	S
28	10	0	0	0	S
29	160	0	0	0	S
30	640	0	0	0	S
Mean	172.33	37.57	31.67	20.67	
%Fluorescence	100	21.85	18.37	11.99	

H = homogenou type S = speckled type P = peripheral type.



Histogram : Show time of storaged substrates at-20°C.

= rat liver cell = goose red blood cell.

= chicken red blood cell = human white blood cell.

Discussion

In this experiment the rosette-forming lymphocyte value assumed to be T-cells (5,8) , of 10 nornal adults had the mean of 64% by dextran and 65% by Ficoll-Hypaque separation which was in agreement with other reports. It was reported that in normal 18-45 yeras old male and female had 65% T-cells in blood (5). In addition, by using sandwich radio-immuno-labelling method for separating lymphocyte from blood, it is reported that normal persons had 66% T-cells (8).

The processes of lymphocyte separation by Ficoll-Hypaque base on the difference of density and relative viscosity. Small and large lymphocytes were different in the density and relative viscosity (6). This reason could answer the question that why do total lymphocyte count which was separated by dextran solution was higher increased than by Ficoll Hypaque mixture. By Ficoll-Hypaque mixture there was small lymphocyte only. The phenomenon of rosetting between rosette-forming cells and uncoated sheep erythrocyte was temperature-dependent in that it occured maximally between 4-25°C and failed to occur at 37°C (1). The nature of human T-lymphocyte receptor was unknown but it

was highly unlikely that the binding was antigenically specific. The species of origin of the erythrocyte was critical, however, in that resette did not occur with uncoated human, rabbit, pigeon, mouse, rat, monkey, cow, cat, chicken or guinea pig erythrocytes and thus far been seem only with sheep, goat, horse and pig erythrocytes. The rosette cell examined by dry smear method. Because the pseudorosette cells with occurred from granulocyte, could be differentiate by examining its difference of nucleus. In addition, the smear slide by kept for record or for reevaluation for a long time.

บทคัดย่อ

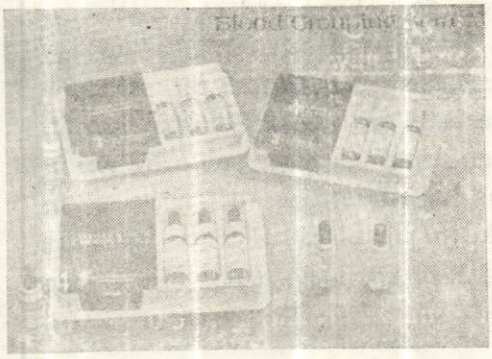
จากการเปรียบเทียบระหว่างวิธี dextran floatation กับ Ficoll - Hypaque separation เพื่อแยก lymphocyte ออกจากเลือดนั้น ปรากฏว่าสำหรับวิธี dextran floatation เลือดจะถูกแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนกลางได้แก่ เม็ดเลือดแดง, เม็ดเลือดขาวบางส่วนและ plate lsts, สำหรับส่วนบนเป็น plasma ที่เต็มไปด้วยเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้งหมดมี $28.0 \times 10^6 \pm 6.06 \times 10^6$ cells/ml ซึ่งเป็นพวก mononuclear cells เสีย $16.25 \times 10^6 \pm 6.43 \times 10^6$ cells/ml และประกอบด้วย T-rosettes 64.21 ± 10.04% สำหรับวิธี Ficoll-Hypaque separation นั้นปรากฏว่าเลือดที่แยกได้เป็น 2 ส่วนเช่นเดียวกัน ส่วนล่างเป็นพวกเม็ดเลือดแดงและ granulocyte ส่วนแถบขาวด้านบนประกอบด้วย mononuclear cell $11.25 \times 10^6 \pm 2.09 \times 10^6$ cells/ml เมื่อคิดจากเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้งหมด $12.0 \times 10^6 \pm 2.21 \times 10^6$ cells/ml และประกอบด้วย T-rosettes 65.06 ± 8.83%

ถึงแม้ว่าจำนวน lymphocyte ที่นับได้จากวิธี dextran floatation สูงกว่าแต่เปอร์เซ็นต์ของ T-lymphocyte ต่อการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดจะมีค่าต่ำกว่าวิธีของ Ficoll-Hypaque separation อีกทั้งยังมีการปะปนของเม็ดเลือดขาวและ platelet เป็นจำนวนมาก

Wellcome Reagents Limited
Wellcome Research Laboratories
Beckenham Kent England BR3 3BS

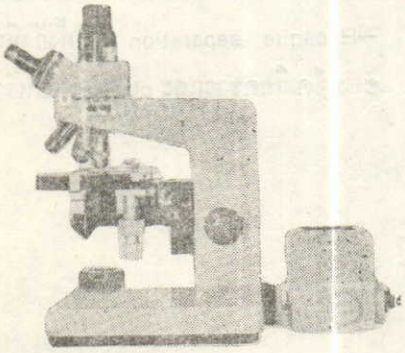
Serving Laboratory Medicine Worldwide

ORTHO DIAGNOSTICS INC
Raritan, New Jersey 08869, U.S.A.



ALSO AVAILABLE

- Clinical Chemistry
- Haematological Reagents
- Immunological Reagents (Immuno Precipitating Sera, Prepurex pregnancy test, Salmonella O Antisera, Salmonella H Antisera)
- Microbiological Reagents (Shigella Agglutinating Sera, Streptococcal Grouping Sera, Stained Suspension, Anti-Streptolysin O Reagents, Bacteriological Culture Medium, Animal Sera)
- Radio Immunoassay Reagents
- Tissue Culture Media and Solutions
- Venereal Disease Diagnostic Reagents (Gonococcus Antigen, VDRL Antigen)
- Veterinary Reagents
- Viral Diagnostic Reagents



The following are trademarks of Ortho Diagnostics:

- AFFIRMAGEN Reagent Red Blood Cells (Human)
- ANTIGRAM Antigen Profile
- FIBRINDEX Thrombin (Human)
- GRAVINDEX Slide Test for Pregnancy
- HAPINDEX Counterelectrophoresis Test for detecting Hepatitis Associated Antigen (Hepatitis B Antigen)
- IDENTIGEN Reagent Red Blood Cells (Human)
- MONOSPOT Slide Test for Infectious Mononucleosis
- ORTHO Abnormal Plasma Coagulation Control
- ORTO A_2 Cells
- ORTHO Anti-Human Serum
- ORTHO Bovine Albumin
- ORTHO Brain Thromboplastin
- ORTHO Coombs Control
- ORTHO Harris Hematoxylin Modification
- ORTHO Plasma Coagulation Control (Human Plasma)
- RARICELL Reagent Red Blood Cells (Human)
- RhoGAM Rh_o (D) Immune Globulin (Human)
- SELECTOGEN Reagent Red Blood Cells (Human)
- SICKLEDEX Tube Test for Hemoglobin S
- THROMBOFAX Reagent (Partial Thromboplastin)
- Activated THROMBOFAX Reagent (Partial Thromboplastin with Activator)

BERLI JUCKER CO. LTD.
Hospital & Scientific Section
PANUNEE BLDG., 518/3 PLOENCHIT ROAD
TEL. 2510393, 2529785, 2525878, 2531105, 2525603

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

THE ISOLATION OF SALMONELLA SPECIES FROM ANIMAL FEEDING STUFF

บังอร มีมณี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
เนตร สุวรรณคฤหาสน์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) Cert. Imm., Cert. Med. Micro.*

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อ ซาลโมเนลลา ในอาหารสัตว์จากร้านอาหารสัตว์ในเชียงใหม่ โดยใช้ Nutrient broth เติมลงในตัวอย่างอาหาร เข้าตู้อบที่ 37°ซ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลง Mc Conkey และ SS agar แล้วเติม Selenite F broth ลงในขวด Nutrient broth เท่าตัว นำเข้าตู้อบที่ 43°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลง Mc Conkey และ SS agar หลังจากเข้าตู้อบที่ 37°ซ นำเชื้อที่สงสัยถ่ายลง TSI แล้วนำไปทำ Biochemical test รายใดที่สงสัยว่าเป็น Salmonella ให้ทำ Serological Typing ยืนยันอีกครั้ง

ผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างอาหาร 141 ตัวอย่าง พบ Salmonella group A, 0.7% group B, 0.7% group C_1, 2.1% group D, 0.7% group E, 1.4% และ Arizona 1.4%

บทนำ

ในปี 2520 สมชาย นิยมไทย และเนตร สุวรรณคฤหาสน์ ได้ทำการวิเคราะห์เชื้อจากโรงงานฆ่าสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่ และได้พบเชื้อซาลโมเนลลาถึง 14% เกิดมีปัญหาว่าเชื้อที่พบเหล่านั้นจะมาจากแหล่งใด อาจติดมากับคนเลี้ยงสัตว์ หรือไม่ก็เจือปนอยู่ในอาหารเลี้ยงสัตว์ จึงได้ทำการวิเคราะห์อาหารเลี้ยงสัตว์นี้ เพื่อจะได้ทราบข้อมูลว่าอาหารเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะหมูมีเชื้อโรคเจือปนหรือไม่.

วัตถุและวิธีการ

ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 12.5 กรัม ใส่ขวดปากกว้างขนาด 4 ออนซ์ เติม Nutrient broth ลงไป 37.5 ม.ล. เข้าตู้อบที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำมาถ่ายเชื้อลง Mc Conkey และ SS agar นำจานเลี้ยงเชื้อทั้งสองเข้าตู้อบที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง เติม Selenite F broth (double strength) 37.5 ม.ล. ลงในขวด Nutrient broth เอาเข้าตู้อบที่ 43°ซ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด

* ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นำมาถ่ายเชื้อลงบน Mc Conkey และ SS agar เอาจานเข้าตู้อบที่ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง

จาก Mc Conkey และ SS agar ทั้งสองครั้งนำมาเลือกโคโลนี ที่สงสัยจะถ่ายเชื้อลงบน TSI, เอา TSI เข้าตู้อบ 37°ซ นาน 24 ชั่วโมง นำ TSI ที่สงสัยไปทดสอบ Biochemical test และทำ Salmonella Typing ยืนยันอีกครั้งหนึ่ง.

ผลการทดสอบ

จากการเก็บตัวอย่างอาหารสัตว์จากร้านอาหารสัตว์ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 141 ตัวอย่าง พบ Enteropathogenic bacteria 2 ชนิด คือ 1. Salmonella group จากอาหารเลี้ยงสุกรประเภทวัตถุดิบ มีถั่วลิสงพิเศษ ข้าวโพดบดละเอียด กระดูกและถั่วเหลือง 2. Arizona group จากอาหารประเภทรำหยาบและถั่วลิสงพิเศษ ดังแสดงในตาราง

ตารางแสดง เชื้อ Enteropathogenic bacteria ที่พบในอาหารเลี้ยงสัตว์

เชื้อที่พบ	ตัวอย่างอาหาร	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	คิดเป็นร้อยละ
Salmonella group A	ถั่วเหลือง	1	0.7
Salmonella group B	ถั่วเหลืองพิเศษ	1	0.7
Salmonella group C_1	ถั่วลิสงพิเศษ, กระดูก ถั่วลิสงธรรมดา	3	2.1
Salmonella group D	ถั่วลิสงธรรมดา	1	0.7
Salmonella group E	ถั่วลิสงพิเศษ ถั่วลิสงธรรมดา	2	1.4
Arizona	รำหยาบ, ถั่วลิสงพิเศษ	2	1.4

วิจารณ์ผลการทดสอบ

ตามที่ สมชาย นิยมไทย และ เนตร สุวรรณคฤหาสน์ ได้ทำการวิเคราะห์เชื้อซาลโมเนลลา จากโรงงานฆ่าสัตว์จังหวัดเชียงใหม่ และได้พบเชื้อ 14% นั้น อาหารเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะหมูอาจเป็นสาเหตุอันหนึ่ง ซึ่งนำเชื้อมาสู่หมูได้ สำหรับวัวและควายนั้นคงไม่ใช่เกิดจากอาหาร เนื่องจากวัวและควายในภาคเหนือส่วนมากใช้หญ้าเป็นอาหารหลัก ในอาหารสัตว์นอกจากจะพบเชื้อซาลโมเนลลาแล้ว เนตร สุวรรณคฤหาสน์ ยังพบเชื้อ pathogenic E coli ในอาหารสัตว์ด้วย

สำหรับการทดสอบอาหารสัตว์ครั้งนี้ ได้แบ่งอาหารออกเป็น 3 ประเภท คือ อาหารสำเร็จรูป, หัวอาหารและวัตถุดิบ แต่พบเชื้อจากวัตถุดิบอย่างเดียว ผลจากการทดสอบครั้งนี้

พอจะบอกได้ว่าคุณภาพของอาหารเลี้ยงสัตว์จะส่งผลสะท้อนมายังผู้บริโภคได้ ในระยะนี้นักวิจัยน่าจะสนใจในเรื่องของแอฟลาทอกซินที่มีอยู่ในอาหารสัตว์ ซึ่งเป็นสาเหตุอันหนึ่งของมะเร็งตับในคนได้.

Abstract

Isolation of Enteropathogenic bacteria from animal food in Chiangmai's markets used the nutrient broth and incubated at 37°C for 24 hrs. After that inoculated the cultures onto Mc Conkey and SS agar and then added the selenite F broth into the bottle incubated at 43°C for 24 hrs. After incubated, the cultures were inoculated onto Mc Conkey and SS agar picked the non lactose ferment colony into TSI and identify by Biochemical test and then confirmed by serological typings. The results were:- Salmonella group A were found in 0.7% group B, 0.7% group C_1, 2.1% group D, 0.7% group E, 1.4% and Arizona, 1.4% (from 141 samples). The contaminated animal food could be a possible source of infection with such micro organisms in rural communities.

เอกสารอ้างอิง

1. Harvey, R.W.S. and Price, T.H.: The isolation of Salmonella from animal feeding stuff, J. Hyg (Camb) 65:237–243, 1967.
2. Suwankrughasn N.: Isolation of pathogenic E coli from animal food and Transmissible R-factor detection. Mod. Med. Asia 13: 5-6, 1977.
3. สมชาย นิยมไทย และ เนตร สุวรรณคฤหาสน์.: Isolation of Salmonella species from slaughter house. Bull, of Chiang Mai Ass. Med. Sc. 10: 149–155, 1977.

Riedel-de Haën

Laboratory Chemicals
Chemicals
Raw materials
Intermediates

for industrial
and pharmaceutical use

OVER 150 YEARS

บริษัท เฮิกซ์ไทย จำกัด
ฝ่ายเวชภัณฑ์
302 ถนนสีลม กรุงเทพฯ
ตู้ ป.ณ. 1495 โทร. 2332981-8
โทรเลขย่อ: ฟาร์มาพร็อก กรุงเทพฯ

Hoechst

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

แลคเตทดีไฮโดรจีเนส ของพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ

บุญยืน สาริกะภูติ Ph.D.*
อุดมภัณฑ์ ขาลสุวรรณ วท.บ.*

บทคัดย่อ

เม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร์ที่ติดเชื้อไข้มาลาเรียชนิดพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีอีเลคโตรฟอรีซีส โดยใช้เซลลูโลสอะซิเตทเมมเบรน แล้วย้อมด้วยสี ปรากฏว่าแบนด์ของแลคเตทดีไฮโดรจีเนสของพาราไซท์ แตกต่างไปจากของโฮสต์ โดยเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ช้ากว่าของโฮสต์ ทั้งนี้ได้ทดลองเปรียบเทียบกับแลคเตทดีไฮโดรจีเนสของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร์ปกติ

บทนำ

ใน ค.ศ. 1945 Speck และ Evans ได้แสดงให้เห็นว่าใน cell free extracts ของ Plasmodium gallinaceum มีเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (LDH) Sherman (1961,1963) ศึกษาโดยวิธีอีเลคโตรฟอรีซีสบน starch gel block พบว่า LDH ของ P.lophurae และ P.berghei เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างไปจาก LDH ในเม็ดเลือดแดงของ host Sherman (1961) หาค่า Michaelis constant (Km) ของ LDH ใน P.lophurae ได้เท่ากับ 1.9×10^{-5}M และ Km ของ LDH ในเม็ดเลือดแดงของเป็ดซึ่งเป็น host ได้เท่ากับ 1.7×10^{-5}M สำหรับ pyruvate ส่วนค่า pH optimum มีค่าเท่ากันทั้งใน P.lophurae และใน host คือเท่ากับ 7.5 Pisphumvidhi และ Langer (1969) ได้ศึกษา LDH ของ cell-free extract ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร์ปกติและของ host - cell-free P.berghei เขาพบว่า LDH ของ free parasite เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าแตกต่างไปจากของ host อย่างไรก็ดี Phisphumvidhi และ Langer (1969) ได้รายงานว่า LDH ของเม็ด

* ภาควิชาชีวเคมี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เลือดแดงของหนูถีบจักร์ที่มีเชื้อ P.berghei อยู่ปรากฏให้เห็นเพียง band เดียวเมื่อแยกโดยวิธีอีเลคโตรฟอรีซีสด้วย Polyacrylamide gel ผู้เขียนจึงได้ทำการทดลองแยก LDH ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร์ที่มีเชื้อ P.berghei โดยใช้วิธีอีเลคโตรฟอรีซีสด้วย cellulose acetate membrane เพื่อที่จะศึกษาว่าการแยกแบบนี้สามารถแยก LDH ของ P.berghei ให้ปรากฏ band แตกต่างไปจาก LDH ของเม็ดเลือดแดงของ host หรือไม่

วัสดุและวิธีทำ

เจาะเลือดจากหัวใจของหนูถีบจักร์ที่มีเชื้อ P.berghei ประมาณ 40% โดยใช้ heparin เป็น anticoagulant นำมา centrifuge ที่ 1000 g เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4°ซ. แยกเอา plasma ออกทิ้ง ล้างเม็ดเลือดแดงที่อยู่ก้นหลอดด้วย 0.9% saline สองครั้ง นำเม็ดเลือดแดงที่ล้างแล้วนี้มาใส่ลงใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.6 ซึ่งเย็นประมาณ 4°ซ. โดยใช้ phosphate buffer 2 ส่วนต่อเม็ดเลือดแดงที่ packed แล้ว 1 ส่วน หลังจากนั้นทำให้เม็ดเลือดแดงแตกออกโดยใช้ ultrasonic disintegrator ให้คลื่นสูงกว่าเสียงผ่านเม็ดเลือดแดงซึ่งผสมอยู่ใน phosphate buffer ที่เย็น 4°ซ. เป็นเวลา 20 นาที รวมสามครั้ง แต่ละครั้งพัก 20 วินาที เพื่อกันมิให้เม็ดเลือดแดงมีอุณหภูมิสูงเกินไป ซึ่งเอ็นไซม์จะถูกทำลาย หลังจากนั้น centrifuge ที่ 5000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 2°ซ. เก็บเอา hemolysate ไปทำอีเลคโตรฟอรีซีสทันที

ในการทำอีเลคโตรฟอรีซีส ใช้ cellulose acetate membrane และ barbiturate buffer pH 8.6 เครื่องมือที่ใช้ทำคือ Beckman model R-100 microzone electrophoresis system ตอนแรกแช่ cellulose acetate membrane ลงใน barbiturate buffer ประมาณ 5 นาที แล้วซับด้วยกระดาษกรองที่สะอาดวาง membrane ที่ชื้นลงในเครื่องมือดังกล่าว หยด hemolysate ปริมาณ 25 ไมโครลิตรลงบน membrane โดยอาศัย applicator ช่วย หลังจากนั้นผ่านกระแสไฟให้โวลตเตจคงที่เท่ากับ 110 โวลต์ นานหนึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25°ซ.)

วิธีย้อมสี

ใช้มีเดียมสำหรับอินคิวเบชั่น 1 ปริมาตร ผสมกับบาร์บิทูเรตบัฟเฟอร์ 1 ปริมาตร ให้ pH ของผสมนี้เป็น 7.1 อินคูเบชั่นมีเดียมเตรียมโดยละลาย NAD, NBT (nitroblue tetrazolium) และ phenazine methosulphate ลงในบาร์บิทูเรตบัฟเฟอร์ pH 8.6 เมื่อผสมเสร็จแล้ว pH จะเป็น 7.4 เนื่องจาก NBT และ phenazine methosulphate มี pH 7.2 และ 7.8 ตามลำดับ นำแผ่นเซลลูโลสอาซิเตทมาอีกแผ่นหนึ่งซึ่งไม่ได้ใช้ทำอีเลคโตรฟอรีซีส สมมติว่าเป็นแผ่น ข. จุ่มในอินคิวเบชั่นมีเดียมที่เตรียมไว้แล้วนี้ให้ชุ่ม แล้วนำไปประกบกับแผ่นเซลลูโลสอะซีเตทที่ได้ทำอีเลคโตรฟอรีซีสของ LDH ไว้ จากนั้นนำ

ไปอินคิวเบตที่ 37° ซ. เป็นเวลา 30 นาที ผลจะปรากฏให้เห็นแถบ LDH เป็นสีน้ำเงินออกมาทั้งสองแผ่น เนื่องจากสารละลายซึมจากแผ่นหนึ่งไปสู่อีกแผ่นหนึ่งได้ เพื่อที่จะให้สารละลายซึมไปสู่อีกแผ่นหนึ่งได้ดี ใน petridish ที่ใช้อินคิวเบตนั้นจำเป็นต้องใช้ผ้าชุบน้ำใส่ไว้ด้วย เพื่อกันไม่ให้แห้ง หลังจากอินคิวเบตแล้วนำไป fix ด้วย formol saline เป็นเวลาประมาณ 5-15 นาที

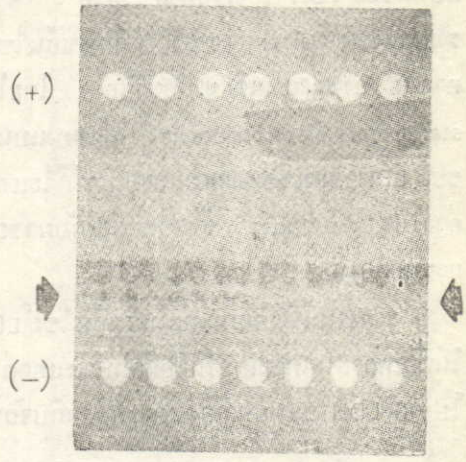
วิธีทำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตให้ใส

แช่แผ่นเซลลูโลสอะซิเตตในกรดน้ำส้ม 0.36 M สีย้อมที่ติดบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตยังคงทนอยู่ได้ในกรดน้ำส้มนี้ ยกแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตออกจากน้ำส้มแล้วแช่ลงในเอธธานอล (ethanol) 95% นาน 1 นาที ต่อจากนั้นแช่ลงใน clearing solution อีก 1 นาที ค่อย ๆ วางแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต ลงบนแผ่นกระจกเรียบ รีดเอาฟองอากาศออกให้หมด อบที่ 80° ซ. นาน 10 นาที แผ่นเซลลูโลสอะซิเตทจะแห้งและใส

ผล

จากการแยกเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase โดยใช้วิธีอีเลคโตรฟอรีซีสด้วยแผ่นเซลลูโลสอะซิเตต ปรากฏว่า extract ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อไข้มาลาเรียพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ มีแบนด์ปรากฏให้เห็นแตกต่างไปจากแบนด์ของเอ็นไซม์จากเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร์ปกติ คือเคลื่อนที่ใกล้ขั้วลบมากกว่า host enzyme ดังในรูป

ผลการทดลอง



รูปแสดง electrophoretic pattern ของ lactate dehydrogenase ใน extract ของ P-berghei-infected mouse erythrocytes และของ normal mouse erythrocytes.

วิจารณ์

หลังจากที่มีการผลิตแผ่นเซลลูโลสอะซิเตตเมมเบรนออกมาใช้ ยังไม่ได้มีผู้นำแผ่นนี้มาใช้แยก LDH ของเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อไข้มาลาเรีย ผู้รายงานจึงได้ทดลองทำเพื่อดูความสามารถในการแยกด้วยวิธีอีเลคโตรฟอรีซีส โดยใช้แผ่นนี้ อนึ่งเครื่อง Beckman model R-100 microzone electrophoresis system ที่คณะแพทยศาสตร์มีอยู่เป็นเครื่องกระทัดรัด สะดวกในการใช้ และสามารถแยกแบนด์เอ็นไซม์ของเชื้อมาลาเรียปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน จากรูปจะเห็นว่าบนแผ่นนี้สามารถแยก sample ได้ถึงครั้งละ 8 sample ซึ่งช่วยทุนเวลาในการทำ เทคนิคการแยกโดยใช้แผ่นเซลลูโลสอะซิเตตจึงดีกว่าวิธีของ Phisphumvidhi และ Langer ที่ใช้ polyacrylamide gel แต่ไม่สามารถแยก

แบนด์ของ LDH ของเชื้อมาลาเรียได้ จากรายงานของ Carter (1973) ผู้ศึกษาเอ็นไซม์ต่าง ๆ ของพลาสโมเดียมเบอร์กีไอ โดยใช้ starch gel electrophoresis ได้แสดงแบนด์ของ LDH ของเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอแตกต่างไปจากของ host ซึ่งสอดคล้องกับผลของการทดลองนี้

รายงานนี้จึงยืนยันให้เห็นว่าเอ็นไซม์ LDH ในเชื้อพลาสโมเดียมเบอร์กีไอมีลักษณะแตกต่างไปจาก LDH ของเม็ดเลือดแดงของหนูถีบจักร์

Abstract

A study of electrophoretic pattern of lactate dehydrogenase in Plasmodium berghei infected mouse red-cell has been made by using cellulose acetate membrane. The result showed characteristic bands of the enzyme originated from the parasite which was different from that of the host.

REFERENCES.

BARNETT, H. The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate, J. Clin Path. 17: 567 - 570, 1964.

CARTER, R. Enzyme variaton in Plasmodium berghei and Plasmodium vinckei, Parasitology 66: 297-307, 1973.

PHISPHUMVIDHI, P. and LANGER. B.W., JR. Malaria Parasite Metabolism: The lactic acid dehydrogenase of Plasmodium berghei. Exp. Parasit. 24: 37-41, 1959.

SHERMAN, I.W. Molecular heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (Plasmodium lophurae). J. Exp. Med. 114: 1049-1062, 1961.

SHERMAN, I.W. Heterogeneity of lactic dehydrogenase in intraerythrocytic parasites Trans. N.Y. Acad. Sci Ser II, 24: 944-953, 1962.

SPECK, J.F. and EVANS, E.A., Jr. The biochemistry of the malaria parasite II Glycolysis in cell-free preparations of the malaria parasites J. biol. chem. 159: 71-81, 1945.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

A COMPARATIVE STUDY OF VARIOUS SUBSTRATES FOR THE DETECTION OF ANF

พัชรีวัลย์ พิชัยพลากร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
ปกรณ์ ไทยานันท์ วท.บ. (จุลชีววิทยา)*
สนิท มกรแก้วเกยูร Ph.D.*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับ antinuclear factor (ANF) โดยวิธี indirect immunofluorescence โดยการทดลองเปรียบเทียบ substrates 4 ชนิด คือ rat liver cell, chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell ในแง่ของ antigenicity และ stability พบว่า rat liver cell มีคุณสมบัติของ antigenicity และ stability สูงที่สุด เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ คือ ให้ผล positive ได้มากกว่า, ดูได้ง่ายและชัดเจนดี, ใช้ตรวจหา antinuclear antibody ได้หลายชนิด และสามารถบอก pattern ต่าง ๆ ของการเรืองแสงได้ ตลอดจนยังเก็บไว้ได้นานอีกด้วย ฉะนั้น rat liver cell จึงเป็น substrate ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ตรวจหา ANF โดยวิธี indirect immunofluorescence.

บทนำ

ในการศึกษาเกี่ยวกับ autoimmune diseases โดยเฉพาะอย่างยิ่ง systemic lupus erythrematosus (SLE) นิยมใช้วิธี indirect immunofluorescence สำหรับตรวจหาระดับของ ANF ในserum ของผู้ป่วย substrate ที่ใช้เป็น antigen มีความสำคัญมากสำหรับวิธีนี้ ถ้า substrate ที่ใช้มีคุณสมบัติที่มี antigenicity สูง จะทำให้ sensitivity ของ test สูงขึ้นด้วย นั่นหมายความว่าทำให้การตรวจพบ ANF ได้ง่ายขึ้นด้วย มี substrate อยู่หลายชนิด ที่ใช้สำหรับตรวจหา ANF เช่น human white

* ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

blood cell, chicken red blood cell, rat liver cell, rat kidney cell เป็นต้น เคยมีผู้ทดลองพบว่า human white blood cell มีคุณสมบัติเป็น antigen ที่ sensitive ดี ในการตรวจหา ANF แต่ไม่ได้เปรียบเทียบ sensitivity กับ substrate อื่น ๆ อีก หาเพียงแต่ว่าสามารถใช้ตรวจหา ANF ได้ในหลาย ๆ โรคด้วยกัน (1,2) และมีบางท่านพบว่า rat kidney cell และ human white blood cell ดีกว่า chicken red blood cell[3] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อจะเปรียบเทียบว่าระหว่าง rat liver cell, chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell ชนิดไหนจะเป็น substrate ที่เหมาะสมที่สุด และ pattern ของการเรืองแสงต่างกันอย่างไร ในการตรวจหา ANF โดยวิธี indirect immunofluorescence

วัตถุและวิธีการ

A. Substrates

1. Rat liver cell; fresh rat liver นำมาทำ frozen section หนาประมาณ 4-6 micron วางบนแผ่นสไลด์, fix ใน cold acetone แล้วนำไปเก็บไว้ใน deep freezer (−20°C) จนกว่าจะนำออกมาใช้

2. Human white blood cell; ใช้เลือดคน group O แยก white cell ออกมาด้วยวิธี dextran floatation ล้าง 3 ครั้ง นำไป dilute ให้เป็น 1:200 (50 cells/high power field) smear บนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง นำไป fix ใน cold acetone เหมือนกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3. Chicken red blood cell; ใช้เลือดไก่ที่เก็บไว้ใน Alsever's solution (v/v) นำมาล้างและ dilute เหมือนข้อที่ 2.

4. Goose red blood cell; เตรียมวิธีเดียวกับ chicken red blood cell

B. Serum

ใช้ serum ของคนไข้ที่แพทย์ให้การวินิจฉัยว่าเป็น SLE 43 ราย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผู้หญิงอายุระหว่าง 21-48 ปี สำหรับ negative control serum ได้จาก donor ที่มาขายเลือดให้แก่หน่วยธนาคารเลือด ซึ่งเป็นผู้ชายทั้งหมด นำมาหา antibody titer โดยใช้ substrate ทั้ง 4 เป็น antigen

C. Indirect immunofluorescent method

นำสไลด์ substrate ทั้งสี่ออกจาก deep freezer แล้วปล่อยให้แห้ง หยดแต่ละ dilution ของ serum ของคนไข้ที่ต้องการหา antibody titer โดย dilute serum เป็น serial two-fold dilution ด้วย phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ลงบน substrate ทั้งสี่อย่างละหนึ่งหยด นำไปใส่ใน moist chamber แล้วอบที่ 37°C, 30 นาที หลังจากอบเสร็จนำสไลด์ substrate มาล้างด้วย PBS, 30 นาที ปล่อยให้แห้งแล้วย้อมด้วย fluorescein iso-

thiocyanate antihuman gamma globulin อีก 30 นาที นำสไลด์มาล้างเหมือนเดิม ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้อง fluorescent ในการทดลองแต่ครั้งได้ทำ positive และ negative control sera ไปด้วยทุกครั้ง ถ้าใน serum มี ANF จะเห็นว่าบริเวณ nucleus ของ cell เรืองแสงสีเขียวแกมเหลือง แต่ถ้าไม่มี ANF บริเวณ nucleus จะมืดไป การอ่าน titer ของ serum โดยดูการเรืองแสงของแต่ละ dilution ของ serum จนกระทั่งถึง dilution สุดท้าย ที่ยังให้ผล positive การเรืองแสงซึ่งถือ dilution นี้เป็น titer.

ผลการทดลอง

จากคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็น SLE 43 ราย ให้ผล positive ANF กับ rat liver cell 30 ราย ส่วนกับ substrate อื่น ๆ ให้ผล positive เพียง 11 ราย และไม่พบเลยว่า rat liver cell ให้ผล negative แล้ว substrate อื่นให้ผล positive เมื่อใช้ rat liver cell เป็น substrate ได้ค่า ANF titer เฉลี่ยเท่ากับ 172 กับ chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38,32 และ 21 ตามลำดับ และถ้าให้เปอร์เซนต์การเรืองแสงของ rat liver cell เป็น 100% จะได้เปอร์เซนต์การเรืองแสง chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell มีค่าเท่ากับ 22,18, และ 12 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สำหรับ serum ของคนไข้ 13 รายที่ให้ผล negative ANF กับ rat liver cell เมื่อนำมา test กับ chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell พบว่าให้ผล negative เช่นเดียวกัน และ normal control serum จาก donor ปกติ 20 รายให้ผล negative test กับ substrate ทุกชนิดเช่นเดียวกัน

rat liver cell เท่านั้นที่สามารถแยก pattern ของการเรืองแสงได้ ส่วน substrate อื่น ๆ ให้เป็นแบบ peripheral type เหมือนกันหมด ในคนไข้ 30 รายนี้ พบว่าให้ homologous ร่วมกับ peripheral type 10 ราย, homologous ร่วมกับ speckled type 4 ราย. homologous อย่างเดียว 3 ราย และ speckled type อย่างเดียว 13 ราย สำหรับ nucleolar type ไม่พบเลย ในการทดลองนี้ และพบว่า serum ที่ให้การเรืองแสงแบบ speckled type ให้ผล negative test กับ substrate อื่น ๆ ทั้งหมด (serum no. 14–30)

วิจารณ์

จากผลการทดลองโดยใช้ serum ของคนไข้ที่สงสัยว่าจะเป็น SLE เพื่อหา ANF โดยวิธี indirect immunofluorescence พบว่า rat liver cell เป็น substrate ที่มี antigenicity ที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ substrate อื่นอีกสามชนิด และ human white blood cell มี antigenicity ต่ำที่สุด คือยังต่ำกว่า chicken

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบ antinuclear antibody titer ที่ได้จาก substrate แต่ละชนิด

Serum No.	Antinuclear antibody titer				pattern of fluorescence
	rat liver cell	chicken red blood cell	goose red blood cell	human white blood cell	
1	20	160	80	80	H, P
2	160	40	20	20	H, P
3	80	80	40	40	H, P
4	160	40	40	40	H, P
5	160	320	320	320	H, P
6	40	40	40	160	H, P
7	80	40	40	20	H, P
8	40	0	0	0	H, P
9	10	10	10	20	H, P
10	80	0	0	0	H, P
11	80	80	40	20	H
12	160	160	160	20	H
13	80	160	160	40	H
14	40	0	0	0	H, S
15	80	0	0	0	H, S
16	80	0	0	0	H, S
17	20	0	0	0	H, S
18	80	0	0	0	S
19	10	0	0	0	S
20	320	0	0	0	S
21	20	0	0	0	S
22	640	0	0	0	S
23	640	0	0	0	S
24	640	0	0	0	S
25	320	0	0	0	S
26	160	0	0	0	S
27	160	0	0	0	S
28	10	0	0	0	S
29	160	0	0	0	S
30	640	0	0	0	S
Mean	172	38	32	21	
% Fluo-rescence	100	22	18	12	

H = homogenous type S = speckled type P = peripheral type.

red blood cell ซึ่งมีผู้ทดลองบางท่านพบว่า human white blood cell มี antigenicity สูงกว่า chicken red blood cell[3] การดู pattern ของการเรืองแสงเมื่อใช้ rat liver cell ดูง่ายกว่าและชัดเจนดีกว่า substrate อื่น ๆ pattern ของการเรืองแสงพอจะบอก clinical syndrome ได้ เช่น SLE, rheumatoid arthritis, mix connective tissue or scleroderma และ myositis ส่วนจะพบแบบ pheripheral, homogenous, speckled และ nucleolar types ตามลำดับ สำหรับ SLE ให้ผล positive ANF ถึง 9%[4,5] จะเห็นว่า speckled type หรือ homogenous ร่วมกับ speckled type ถึงแม้จะมี titer สูง กับ rat liver cell แต่กับ substrate อื่นให้ผล negative ทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก speckled type เกิดจากมี antibody ไป react ต่อ nuclear component บางอย่างบน rat liver cell แต่ไม่มีใน human white blood cell, chicken red blood cell, และgoose red blood cell[6]

ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองเก็บ substrate ทั้งสี่นี้ที่ −20°C แล้วนำมาตรวจดูผลของการเรืองแสงทุก ๆ สัปดาห์ พบว่า rat liver cell เก็บไว้ได้นานที่สุด อย่างน้อย 9 สัปดาห์ โดยยังมีคุณภาพของการเรืองแสงเหมือนเดิม ส่วน chicken red blood cell, goose red blood cell และ human white blood cell เก็บได้นานอย่างน้อย 5 สัปดาห์ แต่สำหรับ human white blood cell ดูเหมือนว่าจะเก็บไว้ได้นานกว่า chicken และ goose red blood cell เนื่องจากสัปดาห์ที่ 9 ยังให้ผล positive ชัดเจนดี (+3) substrate ที่จะนำมาเป็น antigen สำหรับวิธี indirect immunofluorescence นั้น ถ้าให้การเรืองแสงต่ำกว่า +3 แล้ว ไม่ควรนำมาใช้เป็น antigen.

Abstract

Four different kinds of substrates for detecting antinuclear factor (ANF) using indirect immunofluorescent method have been studied in this paper. The antigenicity and stability of this four substrates; rat liver cell, chicken red blood cell, goose red blood cell, and human white blood cell were compared. It was found that the antigenicity and stability of liver cell were better than the other three substrates, because when using rat liver cell, it was easy to be detected, more positive result, differentiated pattern of fluorescence, and more than one kind of antibodies could be detected. In addition, rat liver cell could be preserved more than 9 weeks at −20°C with no loss of antigenicity. Therefore, rat liver cell was a suitable substrate for indirect immunofluorsecence.

เอกสารอ้างอิง

1. Gibson, D.C., and Quarles, J.M. : Immunofluorescent detection of antinuclear factor using washed pooled peripheral human leukocyte. Am. J. Clin. Path, 51 : 440–444, 1969.

2. Faber, V., Elling, P., Norup, G., Mansa, B., and Nissen, N.I. : An antinuclear factor specific for leukocyte. Lancet 2: 344–345, 1964.

3. Clamate, J.E., and Nakamura. R.M. : Indirect immunofluorescent antinuclear antibody test : Comparison of sensitivity and specificity of different substrates. Am. J. Clin. Path, 58 : 388–393, 1972.

4. Fries, J.E., and Holman, H.R. : Systemic lupus erythrematosus : A clinical analysis. W.B. Saunders company. Philadelphia, London, Toronto. pp. 104–120, 1975.

5. Husain, M., Neff, E., Daily, E., Townsend, J., and Lucar, F. : Clinical significant of titer and fluorescent pattern. Am, J. Clin Path. 61: 59–65, 1974.

6. Tan, E.M. : Relationship of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in SLE. J. Lab. Clin Med. 70 : 800–812, 1967.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

การควบคุมคุณภาพเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการ การคัดเลือกและการใช้สถิติเข้าช่วยในการคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางปฏิบัติการ

ขวัญชัย รัตนเสถียร Ph.D.*
เกรียงศักดิ์ อิ่มใจ วท.ม.*

บทคัดย่อ

การใช้วิธีการทางสถิติเพื่อช่วยในการคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้น เราใช้เพื่อช่วยตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการตรวจวิเคราะห์เป็นหลัก ทั้งนี้โดยส่วนใหญ่จะตรวจสอบถึงความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์ และนอกจากนั้นอาจใช้ในการหาความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ในกรณีที่มีการเปรียบเทียบกัน

การดำเนินงานเกี่ยวกับห้องปฏิบัติการนั้นมีส่วนประกอบสำคัญที่จะช่วยให้งานดำเนินไปด้วยดีอยู่หลายประการ เช่น ด้านบุคคลากร สถานที่ และเครื่องมือเครื่องใช้ซึ่งหมายความรวมไปถึงน้ำยาต่างๆ ระบบการควบคุมคุณภาพ การจัดระบบการตรวจวิเคราะห์ และประการสุดท้ายที่สำคัญคือการบริหารงานในทางการแพทย์ นั้นหัวใจสำคัญของการตรวจวิเคราะห์คือ ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ ซึ่งข้อนี้ต้องอาศัยระบบการควบคุมคุณภาพที่มีประสิทธิภาพดี ระบบการควบคุมคุณภาพกล่าวโดยกว้างๆ จะประกอบด้วยสำคัญ 2 ส่วน คือ การหามาตรการระวังป้องกันข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น กับการตรวจสอบหาข้อผิดพลาด หรือความแปรปรวน (Variance) ของกรรมวิธีที่ใช้งานด้านตรวจวิเคราะห์ รวมไปจนถึงการแก้ไขข้อผิด

*ภาควิชาเคมีคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พลาดที่เกิดขึ้นด้วย[1,2] ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการนั้นวิธีการตรวจซึ่งนำมาใช้งานมีส่วนสำคัญมากต่อผลการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการคัดเลือกวิธีการใด วิธีการหนึ่งมาใช้งาน จึงควรได้รับการพิจารณาอย่างละเอียดถี่ถ้วน (ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งของการควบคุมคุณภาพด้วยการระวังป้องกัน) จุดหลักที่ควรได้รับการพิจารณาในการคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์ก็คือ **ความเชื่อถือได้** (Reliability) **ความวางใจได้** (Dependability) และ **การใช้งานในทางปฏิบัติ** (Practicability) ซึ่งในรายละเอียดเราควรตรวจสอบดังต่อไปนี้

ความเชื่อถือได้ เป็นคำที่ใช้รวมกันสำหรับคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ความถูกต้อง (Accuracy) ความแม่นยำ (Precision) และความสามารถหรือความไวในการตรวจวิเคราะห์ (Sensitivity)

ความวางใจได้ เป็นคำรวมสำหรับคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ความรวดเร็ว (Speed) ค่าใช้จ่าย (Cost) ทักษะที่ต้องการ (Technical Skill Requirements) ความยุ่งยาก (Sophistication) ความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการและวัสดุต่างๆ (Laboratory safety and supplies)

การใช้งานในทางปฏิบัติ ข้อนี้เป็นการพิจารณาโดยรวม ๆ ถึงคุณสมบัติข้อดีข้อเสียจากการตรวจ 2 ประการแรกในด้านเปรียบเทียบหาความเหมาะสมว่าจะมีปัญหาอะไรหรือไม่อย่างไรเมื่อนำมาใช้งานจริง ๆ การพิจารณาคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ต้องทำกันอย่างอย่างละเอียดถี่ถ้วนโดยเฉพาะในประการแรก เกี่ยวกับความเชื่อถือได้นั้น หากวิธีการตรวจวิเคราะห์ใดมีคุณสมบัติข้อนี้ไม่ดีถึงคุณภาพที่ต้องการ เราสรุปได้ทันทีว่าวิธีการนั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้งาน

ระบบการควบคุมคุณภาพนั้น หากกล่าวอย่างสั้น ๆ ก็เป็นการจัดการเกี่ยวกับความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของขบวนการวิเคราะห์ต่าง ๆ นั่นเอง[3] ดังนั้นปัญหาหลักในการคัดเลือกเอาวิธีการใด วิธีการหนึ่งมาใช้งานจะเกี่ยวข้องกับการตรวจสอบความถูกต้อง และความแม่นยำของวิธีการนั้น และในการตรวจสอบคุณสมบัติสองประการนี้ เราจำเป็นต้องอาศัยสถิติเข้าช่วย ซึ่งสถิติที่นำมาใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติของวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นส่วนใหญ่ก็ใช้แบบง่าย ๆ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีในหมู่นักวิทยาศาสตร์ทั่วไป ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการใช้สถิติเข้าช่วยวิเคราะห์นั้นจึงอยู่ที่การใช้สถิติอย่างถูกต้องตามหลักวิชาเป็นสำคัญ เพราะการใช้สถิตินั้นให้ทั้งผลดีและผลเสียได้ในเวลาเดียวกัน เคยมีผู้จัดอันดับการโกหกไว้ในคำภาษาอังกฤษว่า Lie, Damn Lie, Statistics โดยผู้จัดอันดับมุ่งจะเน้นให้เห็นถึงการใช้สถิติอย่างไม่ถูกต้องว่า เป็นการโกหกที่แนบเนียนมากที่สุด การโกหกโดยอาศัยสถิตินั้นจะพบมากในวงการโฆษณา

สถิติที่ใช้ในการคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อนำมาใช้งานนั้นมีเช่น

1. การตรวจค่าศูนย์กลาง (Central Tendency) ซึ่งประกอบด้วยการตรวจหาค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าจุดรวม (Mode) และค่าถึงกลาง (Median)

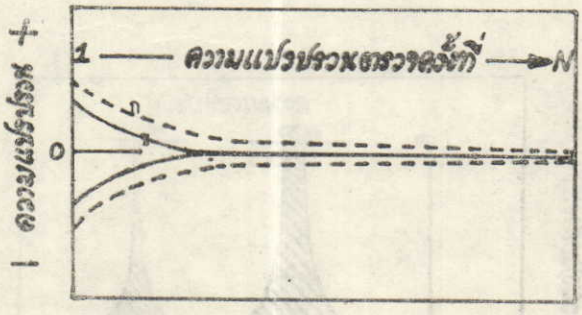
2. การตรวจความกระจาย (Dispersion Tendency) ซึ่งประกอบด้วยการตรวจหาช่วง (Range) ความบ่ายเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) ค่าความแปรปรวน (Variance, V) และค่าสัมประสิทธิของความแปรปรวน (Coefficiant of variation, CV) เป็นต้น

3. การตรวจหาความสัมพันธ์ (Correlation) ซึ่งประกอบด้วยการตรวจสอบความแตกต่าง (Different, d) โดยการใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น t-test, Q-test หรือ Chi square test แต่ส่วนใหญ่เราจะใช้เพียง t-test เท่านั้น นอกจากนั้นก็มีการตรวจหาสัมประสิทธิของความสัมพันธ์ (Correlation coefficient,r) หรือเส้นถอยหลัง (Regression line)

การตรวจในข้อที่ 1 นั้น เพื่อตรวจดูการกระจายของข้อมูล โดยจะพบว่าค่าทั้ง 3 อย่างที่ตรวจมีค่าเท่ากัน เมื่อข้อมูลกระจายแบบปกติ (Normal or Gaussian Distribution) สำหรับการตรวจ 2 ประการหลังนั้นสูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการคำนวนนั้นเป็นสูตรที่อาศัยสมมติฐานว่าการกระจายของข้อมูลเป็นแบบปกติ ดังนั้นเราจึงควรคำนึงถึงจุดหลักนี้ด้วย นั่นคือเราจะมีจำนวนข้อมูลที่มากพอควร สำหรับนำมาใช้งานทางสถิติโดยทั่วไป ยอมรับกันว่าจำนวนข้อมูลมากกว่า 20 อันนั้นมากพอ

การตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นมีปัญหาพื้นฐานเกี่ยวกับการแปรปรวนหรือความบ่ายเบนมาตรฐานอยู่ 2 ประการคือ

1. ในการตรวจสอบหาความแปรปรวนของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยทั่วไปจะพบว่า การตรวจสอบครั้งแรก ๆ นั้นค่าแปรปรวนจะสูงกว่าการตรวจสอบครั้งต่อ ๆ ไป (ดูรูป 1.1) จะเห็นว่าในรูปที่ 1.1 ก. นั้นความแปรปรวนตอนแรก ๆ จะสูงแล้วลดต่ำลงเรื่อย ๆ จนถึงระดับคงที่ระดับหนึ่ง การที่ค่า SD หรือ CV สูงในช่วงแรกๆ นั้นจะเห็นว่าเนื่องมาจากการที่บุคคลากรยังไม่คุ้นเคยกับวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นเป็น

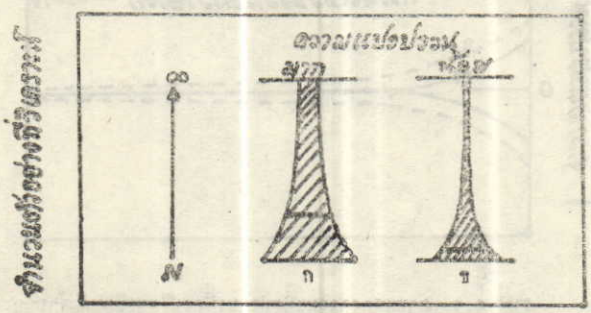


รูปที่ 1.1 ภาพแสดงความแปรปรวนเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนครั้งที่ทำการวิเคราะห์

สำคัญ และเมื่อใช้งานบ่อย ๆ เข้าประกอบกับความสามารถและประสบการณ์ของบุคลากรที่มีเพิ่มขึ้น จึงทำให้ค่าของความแปรปรวนลดต่ำลงมาอยู่ที่ระดับคงที่ระดับหนึ่งซึ่งเป็นค่าของความแปรปรวนที่แท้จริงของวิธีการตรวจวิเคราะห์

2. จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สำหรับการตรวจหาความแปรปรวน ก็ควรได้รับการพิจารณาด้วย เนื่องจากจะพบว่าความแปรปรวนจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อจำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้นและจะลดลงจนเกือบจะเป็นศูนย์เมื่อจำนวนตัวอย่างเป็น ∞ (5) รูปที่ 1.2 ก. และ ข. แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของความแปรปรวนสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำต่ำและสูงตามลำดับ จากรูปนี้จะเห็นว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำต่างกันอาจแสดงให้เห็นได้โดยทางสถิติว่ามีความแม่นยำเท่ากัน ถ้าหากเราขาดการพิจารณาทางด้านจำนวนตัวอย่าง ที่ใช้ในการตรวจสอบความแม่นยำ

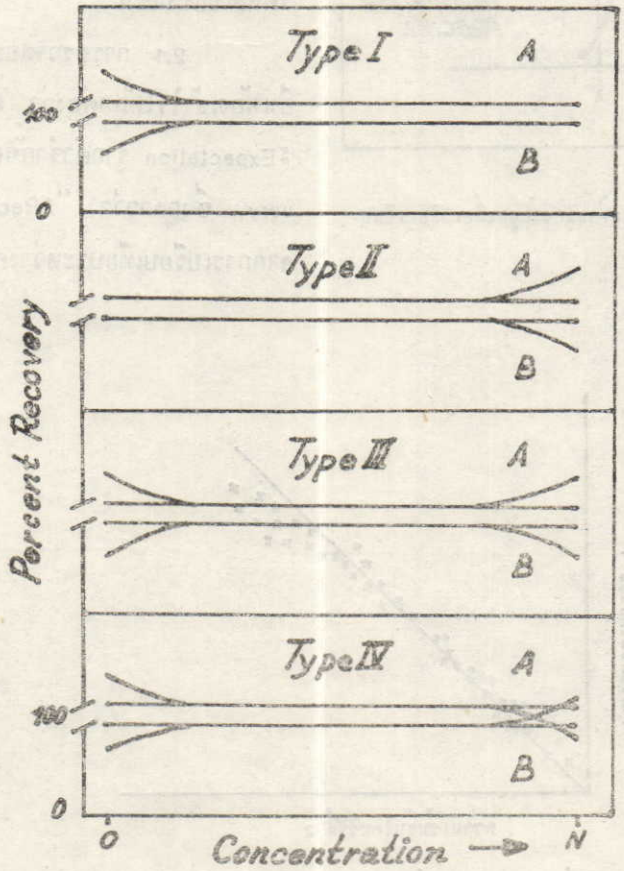
จากปัญหาพื้นฐาน 2 ประการที่กล่าวแล้วนั้น ทำให้เห็นว่าก่อนที่จะนำเอาวิธีการตรวจวิเคราะห์ใดๆ มาเปรียบเทียบกัน เราต้องตรวจสอบหาค่าของความแปรปรวนที่ดีที่สุด (Optimum Condition Variance, OCV) ของแต่ละวิธีเสียก่อน และควรคำนึงถึงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบด้วย นอกจากนั้นการคำนวณทางสถิติเพียงอย่างเดียว เราไม่อาจหาข้อสรุปได้เสมอไป จึงควรหามาตรการเพิ่มเติมบางอย่างเข้าช่วยเสริมเพื่อประกอบการพิจารณาปัญหาที่เห็นได้ชัดว่าเราไม่อาจสรุปได้จากการใช้วิธีคำนวณทางสถิติเพียงอย่างเดียว เช่นในการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธี(6) ซึ่งแม้จะพบว่าการคำนวณทางสถิติบ่งว่าวิธีการทั้งสองใช้แทนกันได้ แต่จากการตรวจสอบดูด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าวิธีการทั้งสองนั้นไม่น่าจะใช้ทดแทนกันได้ (โดยไม่มีความแตกต่าง) แต่เหตุที่การคำนวณทางสถิติชี้ให้เห็นเช่นนั้นอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่าง



รูปที่ 1.2 ภาพแสดงความแปรปรวนเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

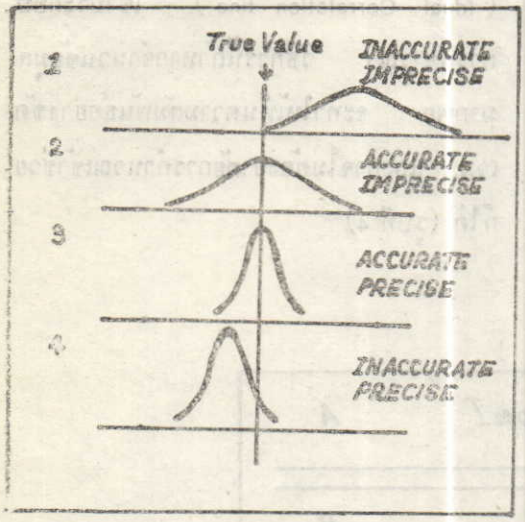
ที่ใช้ในการคำนวณไม่มากพอนั่นเอง และข้อควรระวังประการหนึ่งในการคำนวณทางสถิติคือต้องระมัดระวังว่าการคำนวณนั้นถูกต้องจริง ๆ

ลองมาพิจารณาในกรณีที่การคำนวณนั้นใช้จำนวนข้อมูลที่มากพอ จะเห็นว่าความสัมพันธ์ที่ได้จากการคำนวณ และจากที่ได้โดยการประเมินด้วยตาเปล่า จะไม่ขัดกันซึ่งต่างกันกับในกรณีแรก (รูปที่ 2) การตรวจดูความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยตาเปล่าอาจทำได้ง่าย ๆ โดยการเขียนกราฟของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ จากนั้นลากเส้นความสัมพันธ์ดีที่สุด (Ideal Correlation line) เข้าประกอบการพิจารณา วิธีการนี้ถ้าหากจำนวนข้อมูลมากพอ จะทำให้เห็นความสัมพันธ์อย่างชัดเจน และอาจไม่ต้องอาศัยการคำนวณเข้าช่วยก็ได้ (รูปที่ 4)



รูปที่ 2 ภาพแสดงโอกาสของเปอร์เซนต์ Recovery ที่เป็นไปได้

ตัวอย่างการใช้สถิติช่วยในการ คัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์ สิ่งที่ต้องตรวจสอบควรประกอบด้วย

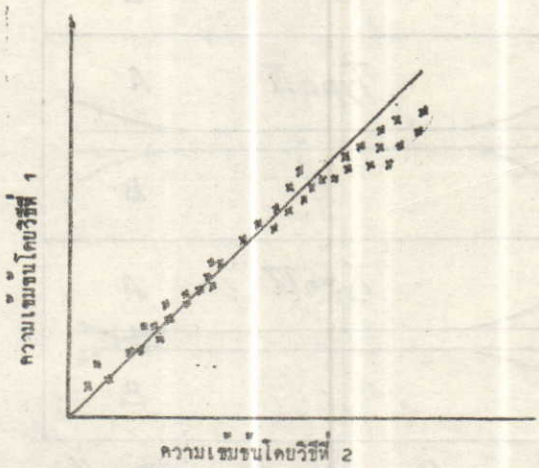


รูปที่ 3 ภาพแสดงการกระจายของข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบกับค่าจริง

1. การตรวจสอบหาความแปรปรวนที่ดีที่สุด อาจทำได้ง่าย ๆ โดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการศึกษานั้นตรวจสอบ ตัวอย่างหนึ่งหรือมากกว่า โดยแบ่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างออกเป็น 20 ส่วนหรือมากกว่า ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่ม ดียวกันนี้เป็นจำนวนหลายๆครั้ง จากนั้นนำเอาผลที่ได้มาคำนวณหาความแปรปรวนแล้วนำมาเขียนเป็นกราฟดังในรูปที่1.1เ มื่อหาค่านี้ได้แล้วจึงดำเนินการขั้นต่อไป

2. การตรวจสอบความถูกต้อง อาจทำได้หลายแบบเช่น

2.1 การตรวจสอบ %Recovery ก่อนอื่นต้องเข้าใจให้ถูกต้องว่า %Recovery ไม่ใช่ %Expectation จากคำจำกัดความของ %Recovery ซึ่งกล่าวว่า "%Recovery คือค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างค่าของสาร (ส่วน



รูปที่ 4 ภาพตัวอย่างแสดงความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยวิธีการตรวจวัดสองแบบ เมื่อลากเส้นที่ทำมุม 45 องศาเข้าไปเปรียบเทียบ

สูตรทางสถิติที่ใช้ในการคำนวณเพื่อคัดเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์

Mean; $\bar{X} = \frac{\Sigma x}{n}$

Standard deviation; $S.D. = \sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{n-1}}$

Coefficient of variation; $CV = \frac{S.D.}{\bar{X}} \times 100$

Unpaired data:

Standard error of mean; $SEM = \sqrt{\frac{(SD_1)^2(n_1-1) + (SD_2)^2(n_2-1)}{(n_1+n_2-2)} \cdot \frac{(n_1+n_2)}{n_1 n_2}}$

$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{SEM}$

$d.f. = n_1 + n_2 - 2$

Paired data:

Standard error of mean; $SEM = \sqrt{\frac{\Sigma(y-x)^2 - (\Sigma y - \Sigma x)^2/n}{n(n-1)}}$

$t = \frac{|\bar{Y} - \bar{X}|}{SEM}$

$d.f. = n - 1$

Correlation coefficient; $r = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\sqrt{\{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2\}\{n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2\}}}$

Linear regression line; $Y = aX + b$

Slope of regression line; $a = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$

Intercept of Y on X; $b = \frac{\Sigma y - a\Sigma x}{n}$

Significant of probability; p

Very Highly Significant (V.H.S.); $p < 0.1\%$

Highly Significant (H.S); $1\% > p > 0.1\%$

Significant (S); $5\% > p > 1.0\%$

Slightly Significant (S.S.); $10\% > p > 5.0\%$

Not Significant (N.S.); $p > 10\%$

ตารางที่ 1 แสดงวิธีบันทึกผลการตรวจ Recovery ของการวิเคราะห์

Serum (ml)	Standard added (ug)	Expected Value (ug)	Amount recovered Total (ug)	Amount recovered Added (ug)	Expectation (%)	Recovery (A)
0.5	0	—	2.7	—	—	—
0.5	1	3.7	3.6	0.9	97.3	90.0
0.5	2	4.7	4.1	1.4	87.2	70.0
0.5	3	5.7	5.0	2.3	87.7	76.7
0.5	4	6.7	6.4	3.7	95.5	92.2
0.5	5	7.7	7.0	4.3	90.9	86.0
Average Values					91.7	83.0
1.0	0	—	5.4	—	—	—
1.0	1	6.4	6.4	1.0	100.0	100,0
1.0	2	7.4	7.3	1.9	98.6	95.0
1.0	3	8.4	8.4	3.0	100.0	100.0
1.0	4	9.4	9.5	4.1	101.0	102.5
1.0	5	10.4	10.0	4.6	96.1	92.0
Average Values					99.1	97.9
Grand Average Values					95.4	90.4

Note

$$\text{Expectation } (\%) = \frac{\text{Total amount recovered}}{\text{Expected}} \times 100$$

$$\text{Recovery } (\%) = \frac{\text{Added standard recovered}}{\text{Amount of standard added}} \times 100$$

ตารางที่ ๒ ตัวอย่างการตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์เหล็ก (๑๒)
โดยการศึกษา % Recovery และการคำนวณทางสถิติอื่น ๆ

No.	Sample Preparation			Detected Values x dilution factor				Expectation		Recovery	
	Control (ml)	Standard (ml)	Water (ml)	SI ug/dl	TIBC ug/dl	SI ug/dl	TIBC ug/dl	Value	%	Value	%
01.	1.00	-	1.00	49.0	244.0	98.0	488.0	-	-	-	-
02.	1.00	0.25	0.75	73.0	220.0	146.0	440.0	148.	98.6	48	96.0
03.	1.00	-	1.00	53.0	220.0	106.0	440.0	-	-	-	-
04.	1.00	0.50	0.50	106.0	220.0	212.0	440.0	206	102.9	106	106.0
05.	1.00	-	1.00	45.0	244.0	90.0	488.0	-	-	-	-
06.	1.00	0.75	0.25	130.0	208.0	260.0	416.0	240	108.3	170	113.3
07.	1.00	-	1.00	41.0	244.0	82.0	488.0	-	-	-	-
08.	1.00	1.00	-	151.0	244.0	302.0	488.0	282	107.1	220	110.0
09.	1.00	-	1.00	65.0	244.0	130.0	488.0	-	-	-	-
10.	1.00	0.30	0.70	90.0	244.0	180.0	488.0	190	94.7	50	83.3
11.	1.00	-	1.00	61.0	244.0	122.0	488.0	-	-	-	-
12.	1.00	0.6	0.40	110.0	244.0	220.0	488.0	242	90.9	98	81.7
Average							470.0	-	100.4	-	98.4
SD							27.3		6.9		15.6
CV (%)							5.8		6.9		13.8
13.	1.00	-	1.50	41.0	178.0	102.5	445.0	-	-	-	-
14.	1.00	0.25	1.25	59.0	200.0	147.5	500.0	152.5	96.7	45	90.0
15.	1.00	-	1.50	41.0	156.0	102.5	390.0	-	-	-	-
16.	1.00	0.50	1.00	81.0	156.0	202.5	390.0	202.5	100	100	100.0
17.	1.00	-	1.50	56.0	200.0	140.0	500.0	-	-	-	-
18.	1.00	0.75	0.75	119.0	222.0	297.5	555.0	290.0	102.6	157.5	105.0
19.	1.00	-	1.50	48.0	167.0	120.0	418.0	-	-	-	-
20.	1.00	1.00	0.50	126.0	189.0	315.0	472.0	320.0	98.4	195	97.5
21.	1.00	-	1.50	41.0	200.0	102.5	500.0	-	-	-	-
22.	1.00	0.30	1.20	67.0	156.0	167.5	390.0	162.5	103.1	65	108.3
23.	1.00	-	1.50	41.0	156.0	102.5	390.0	-	-	-	-
24.	1.00	0.60	0.90	96.0	145.0	240.0	362.0	222.5	107.9	137.5	114.6
Average							442.7	-	101.4	-	102.6
SD							61.5		3.9		9.6
CV (%)							13.9		3.8		9.4
Grand Average							456.4		100.9		100.5
SD							48.6		5.4		11.1
CV (%)							10.6		5.4		11.0

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนที่นับว่าใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิค

การตรวจวิเคราะห์ (ค่าเฉลี่ยของช่วงปกติ)	ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%)		
	1(7)	2(8)	3(9)
โซเดียม (140 มิลิโมลต่อลิตร)	1.8	1.5	0.4
โปแตสเซียม (4.2 มิลิโมลต่อลิตร)	10.0	6.2	3.4
คลอไรด์ (100 มิลิโมลต่อลิตร)	2.0	2.2	0.9
แคลเซียม (2.5 มิลิโมลต่อลิตร)	6.0	2.3	1.6
ฟอสเฟต (140 มิลิโมลต่อลิตร)	10.0	5.6	6.6
บิลิรูบิน (17 ไมโครโมลต่อลิตร)	10.0	20.0	–
โปรตีนรวม (70 กรัมต่อลิตร)	7.0	4.3	3.2
อัลบูมิน (40 กรัมต่อลิตร)	10.0	7.1	3.5
กลูโคส (5.5 มิลิโมลต่อลิตร)	10.5	5.0	4.7
กรดยูริค (0.36 มิลิโมลต่อลิตร)	10.0	8.3	12.3
ยูเรีย (6.7 มิลิโมลต่อลิตร)	10.0	7.4	7.5
โฆเลสเตอรอล (5.1 มิลิโมลต่อลิตร)	10.0	–	8.2

ใหญ่ Standard) ที่ตรวจได้เปรียบเทียบกับค่าของสารที่เติมเข้าไป แล้วคูณด้วย 100" (3) การทำ % Recovery นั้นจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก การเตรียมตัวอย่าง ซึ่งจะต้องจัดเป็นคู่โดยส่วนแรกเป็นตัวยืน ส่วนที่สอง เป็นส่วนที่ได้จากตัวอย่างแรกรวมกับสารที่เติมเข้าไป จากนั้นก็เป็นขั้นตอนของการตรวจวิเคราะห์ และประการสุดท้ายก็คือการคำนวณโดยเราใช้สูตร (ท้ายของตารางที่ 1)

ข้อสังเกตสำหรับการตรวจสอบ Recovery เราอาจทำได้ 2 แบบคือ

2.1.1 โดยการเติมสารที่เป็นของแข็ง (Method of Addition) ความเข้มข้นที่ได้จากวิธีนี้จะเพิ่มเติมจากเดิมเป็นสัดส่วน โดย ตรงกับปริมาณสารที่เติมเข้าไป ตัวอย่างการคำนวณ %Recovery แบบนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1

2.1.2 โดยการผสมสารละลาย (Method of Admixtures) ความเข้มข้นที่ได้จากวิธีการนี้จะเพิ่มหรือลดลงจากเดิมนั้นขึ้น อยู่ กับความเข้มข้นของสารที่เราเติมเข้าไป แต่ค่าจะต่ำกว่าค่าความเข้มข้นสูงสุดระหว่าง สาร ละลายที่นำมาผสมกัน เพราะมีองค์ประกอบทาง

ด้านปริมาตรและการเจือจาง (Dilution Factors) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ตัวอย่างการคำนวณ %Recovery แบบนี้แสดงไว้ในตารางที่ 2

2.2 การเปรียบเทียบ (Comparison) เราอาจเปรียบเทียบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยการใช้วิธีการนั้น ๆ ตรวจสอบตัวอย่างเทียบกับวิธีมาตรฐาน หรือเปรียบเทียบกับค่าที่เชื่อถือได้ เช่น ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (Control Samples) เป็นต้น

2.2.1 การเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Comparison with standard method) วิธีการก็คือ ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกลุ่มหนึ่งด้วยวิธีมาตรฐาน และวิธีที่ต้องการตรวจคัดเลือกจากนั้นนำมาคำนวณทางสถิติ การใช้วิธีการนี้จะมีปัญหาเมื่อยังไม่มีวิธีการใดที่เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจสอบนั้น ๆ เราจะหลีกเลี่ยงโดยการใช้วิธีการที่ 2.2.2

2.2.2 การตรวจสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (Analyses of Control Samples) โดยวิธีนี้เราต้องอาศัยตัวอย่างควบคุมคุณภาพความเข้มข้นต่าง ๆ กันจำนวนมากพอควร ซึ่งบางทีก็เป็นการยากที่จะหาตัวอย่างได้ตามต้องการ อาจแก้ปัญหาได้ง่าย ๆ โดยการประยุกต์เอาวิธีการเจือจาง (Dilution Technique) มาใช้ โดยสมมติว่ามีตัวอย่างควบคุมคุณภาพขนาด 5 มิลลิลิตร อาจเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพให้มีความเข้มข้นได้หลายขนาดโดยการเติมน้ำปริมาตรต่าง ๆ กัน เช่น 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 เป็นต้น ก็จะทำให้ได้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพความเข้มข้นต่าง ๆ กันถึง 5 ขนาด สำหรับค่าของความเข้มข้นของแต่ละตัวอย่างก็สามารถคำนวณออกมาได้ เมื่อได้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพความเข้มข้นต่าง ๆ กันจำนวนเพียงพอแล้วเราก็ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเหล่านั้นด้วยวิธีการที่ต้องการคัดเลือก และนำเอาผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณทางสถิติ

3. การตรวจสอบความแม่นยำ อาจทำได้ง่ายๆ สิ่งแรกก็โดยการตรวจดูค่าที่ตรวจได้ในขั้นตอนที่ 1 นอกจากนั้นยังอาจใช้วิธีการทางสถิติอื่น ๆ เข้าช่วยตรวจสอบความแม่นยำได้ เช่น การตรวจหาสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (CV) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นๆ ข้อสังเกตเกี่ยวกับการตรวจหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนก็คือ ในการหาค่านี้อาจมีด้วยกัน ๒ ลักษณะ คือ

3.1 ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของวิธีการตรวจวิเคราะห์ การตรวจสอบนี้เราทำโดยการตรวจสอบเพื่อหาค่าความแปรปรวนที่ดีที่สุด จากนั้นคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนออกมา

3.2 สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนในการวิเคราะห์ตัวอย่าง การตรวจสอบนี้เราใช้ตรวจสอบจากกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าต่างๆ กัน อยู่ในช่วงหนึ่งเช่น Normal range หรือ Reference range เมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในกลุ่มนี้จำนวนมากพอควร โดยใช้วิธีการที่เราต้องการคัดเลือกแล้วนำเอาผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน

ความแปรปรวนที่หาได้โดยวิธีการนี้ จะมี ความคล้ายคลึงกับความแปรปรวนในการใช้งานประจำวัน (Rountine Condition Variance, RCV) จากการที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของความ แปรปรวน 2 ลักษณะเช่นนี้เราจึงควรทราบว่า ค่า OCV นั้นจะต้องมีค่าต่ำกว่าหรือเท่ากับค่า RCV และถ้าหากค่า OCV สูงกว่าค่า RCV ย่อมแสดงว่ามีความผิดพลาดเกิดขึ้นหรือค่า OCV นั้นเป็นค่าที่ไม่ถูกต้อง

เมื่อเราทำการคำนวณทางสถิติแล้ว การพิจารณาข้อมูลที่ได้เหล่านั้นจะพบว่าในด้านการตรวจสอบความถูกต้องนั้น สามารถใช้ข้อมูลทางสถิติได้โดยตรง ว่าการตรวจสอบนั้นๆ ดีหรือไม่อย่างไร ปัญหาที่จะมีอยู่ที่การแปลผลการตรวจสอบความแม่นยำที่อาศัย วิธี การ ทางสถิติ โดยที่วิธีการทางสถิติที่ใช้กันนั้นไม่สามารถบ่งบอกได้ว่า ความแปรปรวนขนาดใดจึงจัดว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นๆ ดีพอ จำเป็นต้องอาศัย ข้อมูล ที่ได้ รับ การ ศึกษา อย่างละเอียดถี่ถ้วนซึ่งสำหรับ วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางคลินิคบางอย่างนั้นได้รับการศึกษาเป็นอย่างดี (7,8,9) ซึ่งจากผลงานเหล่านี้พอที่จะสรุปได้ถึงความแปรปรวน ที่ยอม รับ ได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 จะสังเกตจากตารางนี้ได้ว่าความแปรปรวนที่ยอมรับกันนั้นในวิ ธีการตรวจสอบแบบเก่า ๆ จะสูงกว่าวิธีการในสมัยปัจจุบัน

4. การพิจารณาถึงความวางใจได้ กล่าวคือวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เราจะคัด เลือก มา ใช้งานควรใช้เวลาในการตรวจสอบน้อย ความยุ่งยากน้อย ราคาถูก มีความต้องการทักษะน้อย ไม่มีปัญหาด้านวัสดุต่างๆนอกจากนั้นควรเป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อการใช้ งาน ใน ห้องปฏิบัติการด้วย

5. การพิจารณาด้านการใช้งาน ใน ทางปฏิบัติ ต้องพิจารณาถึงข้อดีข้อเสียต่าง ๆ ที่ได้ตรวจสอบแล้วทั้งหมด ดูว่ามีข้อดีเพียงพอที่จะนำมาใช้งานหรือไม่ โดยควรคำนึงถึงความน่าเชื่อถือของวิธีการตรวจวิเคราะห์เป็นหลัก คือต้องมีความถูกต้องและความแม่นยำดี เพราะถ้าขาดข้อนี้เสียแล้ว วิธีการตรวจวิเคราะห์นั้นๆ ย่อมให้ประโยชน์ทางด้าน การช่วยวินิจฉัย ทำนายโรค และการรักษาโรคน้อยมาก ในการพิจารณาความถูกต้องและแม่นยำ บางทีอาจพบปัญหาว่าวิธีการหนึ่ง มีความถูกต้องดีแต่เสียในด้านความแม่นยำ หรือในทางตรงกันข้าม ซึ่งลักษณะเกี่ยวกับความถูกต้องและแม่นยำอาจแบ่งได้เป็น 4 แบบ(10) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 ถ้าหากจำเป็นต้องเลือกเอา อย่าง ใด อย่าง หนึ่งระหว่างความถูกต้องกับ ความ แม่น ยำ เรา ควรเลือกเอาวิธีการที่มีความ แม่น ยำ มาก กว่า การ เลือกเอาความถูกต้อง ทั้งนี้เพราะว่าวิธีการที่มีความแม่นยำดีย่อมให้ผลที่แน่นอนกว่า และเมื่อเราใช้องค์ประกอบแก้ไข (Correction Factor) เข้าช่วยเราก็จะได้ผลการตรวจที่ถูกต้องกว่า

Abstract

Techniques of analytical methods selection had been discussed and demonstrated. The application of simple statistical analyses had also been demons-

trated. The selection of analytical methods is one ot the very basic laboratory quality control. This problem should thus be dealt with great care.

เอกสารอ้างอิง

1. Whitehead, T.P.: Quality control in clinical chemistry. John Wiley and Sons, 130 pages, 1st ed., 1977.

2. Buttner, J, Borth, R., Boutwell, J.H., Broughton, P. M. G., and Bowyer, R.C.: International Federation ot Clinical Chemistry. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part I. General principles and terminology. Clin. Chem. 22, 532-540, 1976.

3 Buttner, J., Borth, R., Boutwell, J.H., Broughton, P.M.G., and Bowyer, R.C.: International Federation of Clinical Chemistry. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part II. Assessment of analytical methods for routine use. Clin. Chem. 22, 1922—1932. 1976.

4. Buttner, J., Borth, R., Boutwell, J.H., Broughton, P.M.G., ane Bowyer, R.C.: International Federation of Clinical Chemistry. Provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. Part III. Calibration and control materials. Clin. Chem. 23, 1784—1789, 1977.

5. Diem, K., and Lentner, C.: Scientific Tables/Statistical methods, Documenta Geigy, Basle, Switzerland, p. 154 (pp 146—198), 7th. ed., 1970.

6. ประสิทธิ์ ชนะรัตน์: การใช้สถิติในการคัดเลือกวิธีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เทคนิคการแพทย์สาร ปีที่ 6 ฉบับที่ 3 หน้า 14-20 ประจำเดือนตุลาคม 2520.

7. Tonks, D.B.: Quality control in clinical chemistry laboratories. Canadian Society of Clinical Chemists, Montreal, Canada, 1958.

8. Barnett, R.N,: Medical significance of laboratory results. Am. J. Clin. Pathol. 50, 671—676, 1968.

9, Cotlove, E., Harris, E K., and Williams, G.Z,: Biological and analytic components of variation in long—term studies of serum constituents in normal subjects III. Physiolpgical and medical implications. Clin. Chem. 15, 1028—1032 1970.

10. ขวัญชัย รัตนเสถียร: เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการเคมีคลินิค เอกสารประกอบการประชุมวิชาการและปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 1 หน้า 7 วันที่ 7-8 เมษายน 2520.

11. Manual of Canon 167P calculator.

12. Cinical Chemistry Laboratory Manual, Department of Clinical Chemistry, Chiang Mai University, P. 50—54, 2519.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

บทบรรณาธิการ

การฝึกอบรมทางด้านโลหิตวิทยา ณ ประเทศสิงคโปร์

(Laboratory Methods in the Investigation of Abnormal Hemoglobins)

อรพินธ์ ไชยยารัศมี วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), M.T. (ASCP.)

เมื่อวันที่ 31 ตุลาคม 2520 ข้าพเจ้าได้รับแจ้งจากกรมวิเทศสหการ ให้เดินทางไปฝึกอบรมที่ประเทศสิงคโปร์ ภายใต้แผน ASEAN ซึ่งจะเริ่ม การ ฝึก อบ รม วันที่ 1 พฤศจิกายน 2520 โดยมีระยะเวลา 3 เดือนเต็ม ในเรื่อง Laboratory Methods in the Investigation of Abnormal Hemoglobins ซึ่งความจริงข้าพเจ้าได้รับทราบว่า จะต้องไปในราวๆ เดือนกันยายน 2520 แต่เป็นเพราะทางเจ้าของทุน ASEAN คือประเทศสิงคโปร์ไม่พร้อม จึงเลื่อนมาเป็นต้นเดือนพฤศจิกายน 2520 ดังนั้นเรื่องการเตรียมตัวเดินทาง ซึ่งได้แก่หนังสือเดินทาง, หนังสือรับรองการฉีดวัคซีน และเรื่องอื่นๆ จึงได้เตรียมไว้ก่อนเรียบร้อยแล้ว แต่ติดขัดด้วยรายละเอียดที่ข้าพเจ้าจะต้องไปติดต่อที่ใคร และสถานที่ๆ จะไปฝึกอบรมตลอดจนที่พัก ซึ่งข้าพเจ้าไม่ได้รับทราบเลย เป็นแต่ทราบว่าจะต้องไป ที่ ประเทศสิงคโปร์ ด้วยทุน ASEAN เป็นระยะเวลา 3 เดือน ได้ค่าครองชีพเดือนละ 400 เหรียญสิงคโปร์เท่านั้น ดังนั้นเมื่อข้าพเจ้าทราบวันเดินทางออกจากประเทศไทยแน่นอนแล้ว จึงรีบเดินทางจากเชียงใหม่เข้ากรุงเทพฯ ทันที ถึงกรุงเทพฯ วันที่ 1 พฤศจิกายน 2520 ข้าพเจ้าก็รีบไปสอบถามรายละเอียดอีกครั้งหนึ่ง ที่กรมวิเทศสหการ ก็ไม่ได้อะไรเพิ่มขึ้นมา คงทราบเท่าเดิม แต่ที่เจ้าหน้าที่กรมวิเทศสหการได้กรุณาโทรเลขแจ้งไปที่กระทรวงต่างประเทศของสิงคโปร์ แล้วพร้อมกับปลอบใจข้าพเจ้าว่า ไม่ต้องกังวลเพราะประเทศสิงคโปร์นั้นผู้คนอัธยาศัยดี ไม่มีโจรผู้ร้ายชุกชุมเหมือนที่อื่น ข้าพเจ้าก็ยังใจไม่ดีอยู่นั่นเอง เพราะเดินทางไปคนเดียว และต้องเดินทางกลางคืนด้วย ไม่มีคนรู้จักเลยในสิงคโปร์ และไม่ทราบว่าจะไปพักที่ไหนอีกด้วย แต่คิดในใจว่าลองดู ดังนั้นข้าพเจ้าออกเดินทางโดยสายการบิน Thai International เที่ยวบิน 401 เวลา 19.15 น. ซึ่งถึงสนามบินสิงคโปร์เวลา 21.50 น. ระหว่างทางที่นั่ง

ในเครื่องบิน ข้าพเจ้านั่งใจไม่ดีมาตลอดทาง แต่คิดอยู่ในใจว่าถ้าไม่มีใครมารับ ก็คงจะต้องเข้าพึ่งสถานทูตไทยในสิงคโปร์ก่อนแน่ๆ พอถึงสนามบินขณะที่กำลังยืนหนังสือเดินทางเพื่อขออนุญาตเข้าประเทศอยู่ ก็พอดีเจ้าหน้าที่ตรงนั้นขานชื่อข้าพเจ้า พร้อมทั้งบอกว่ามีเจ้าหน้าที่มารับข้าพเจ้า และเจ้าหน้าที่ผู้นั้นก็มาแนะนำตัวเองว่า มาจาก ASEAN รับข้าพเจ้าขึ้นรถยนต์พาไปที่หอพักของโรงพยาบาลสิงคโปร์ โดยหอพักนั้น ชื่อ King Edward VII Hall หรือชื่อย่อเรียก K.E. Hall เป็นหอพักนักศึกษาแพทย์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ Singapore University ห้องที่ข้าพเจ้าพักอยู่บนชั้น 4 ต้องเดินขึ้นบันไดเท่านั้น ไม่มีลิฟท์ใช้เลย ที่หอพักนี้เขาพักรวมทั้งชายและหญิง โดยแบ่งชั้นกันเท่านั้น ชั้นที่ 1, 2 และ 3 เป็นที่พักของนักศึกษาแพทย์ชาย ส่วนชั้น 4 เป็นของผู้หญิง ห้องพักแคบ ๆ มีเตียง 1 หลัง มีหน้าต่าง 2 บาน เป็นบานเกล็ด ไม่ติดมุ้งลวด เพราะเขาบอกว่าสิงคโปร์เมืองสะอาดไม่มียุง มีโต๊ะเขียนหนังสือพร้อมเก้าอี้ 1 ตัว ๆ 1 ชุด ตู้ไม้ใส่เสื้อผ้าพร้อมกระจก และกุญแจใช้ไม่ได้ 1 ตู้ และมีพัดลมตั้งพื้น 1 อัน เพราะอากาศที่สิงคโปร์นี้ไม่หนาว มีแต่ร้อนกับฝนเท่านั้น เนื่องจากข้าพเจ้าไปถึงหอพักในเวลากลางคืนและดึกมากแล้ว พอเช้า ออกมาจากห้องพักจึงมีนักศึกษาแพทย์มาซักถามและคุยกันเรื่อยลงมาตั้งแต่ชั้น 4 จนถึงห้องอาหาร เพราะเขาไม่เคยเห็นข้าพเจ้าในหอพักมาก่อน อัตราค่าเช่าหอพักที่สิงคโปร์เขาคิดเป็นรายวัน ๆ ละ 6 เหรียญ 40 เซ็นต์ เป็นค่าที่พักและค่าอาหารเย็น 1 มื้อ หลังอาหารเช้าแล้ว ก็มีเจ้าหน้าที่ของกระทรวงต่างประเทศสิงคโปร์มาพบ และพาไปที่ห้อง Lab. ของโรงพยาบาลสิงคโปร์ ซึ่งก็เดินจากที่พักไม่ไกลนัก

สถานที่ที่ข้าพเจ้าจะต้องไปฝึกอบรม เป็น Laboratory อยู่ใน Pediatric Department, Singapore General Hospital, Singapore University การฝึกอบรมเป็นแบบ Self Study และ practice โดยมีผู้เข้าร่วมอบรม 2 คน จากประเทศไทย เป็นแบบปฏิบัติการในห้อง Laboratory ของโรงพยาบาลและจัดทัศนศึกษาด้วย ห้อง Laboratory นี้ไม่ใช่ Central Lab. ของโรงพยาบาล เป็นแต่เพียงใช้เป็น Special Lab. ของคนไข้เด็กเท่านั้น สำหรับข้าพเจ้าเลือกทางด้าน Abnormal Hemoglobins ซึ่งเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานของหน่วยนี้มีแพทย์ 1 คน เป็นหัวหน้าภาควิชาฯ และเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานใน Lab. นี้มีทั้งหมด 5 คน พร้อมทั้ง Senior Technician เป็นหัวหน้าอีก 1 คน มีเจ้าหน้าที่รับ Specimen 1 คน และเจ้าหน้าที่ธุรการอีก 2 คน ข้าพเจ้าได้สามและคุยกับพวกเจ้าหน้าที่ใน Lab. นี้ ส่วนใหญ่ที่เป็น Lab. Technician ไม่ได้จบจากมหาวิทยาลัยเหมือนอย่างของเรา เขาจบ High Scoool แล้วก็มา Train ใน Lab. ของโรงพยาบาล โดยใช้เวลา Train อย่างน้อยๆ วิชาละ 6-12 เดือน แล้วจึงไปทดสอบความรู้ เช่น ถ้าจะเป็น Technician ทาง Hematology ก็ต้องมา Practice ใน Lab. Homatology ของโรงพยาบาลเป็นเวลา 1 ปี ขณะที่ practice นี้อาจมี lecture ซึ่งแพทย์ที่เชี่ยวชาญทางสาขาวิชานั้น ๆ เป็นผู้กำหนดชั่วโมง Lecture ให้หลังเวลาเลิกทำงานแล้ว และผู้เข้าฟังจะต้องเสียเงินค่าฟัง Lecture นี้ เรื่องละ 10 เหรียญ

สิงคโปร์ เมื่อถึงกำหนดครบตามหลักสูตรแต่ละสาขาวิชาแล้ว ก็จะมีการทดสอบความรู้ขึ้น ถ้าสอบผ่านได้ ถึงจะสามารถไปเรียนวิชาอื่น ๆ ต่อไปอีก ดังนั้น ถ้าจะเป็นไปถึง Senior Technician จะต้องเรียนให้หมดทุกสาขาวิชา โดยต้องเรียนอย่างน้อย 4 ปี แล้วต้องทำงานทุก ๆ อย่างนั้นได้หมด และต้องสอบผ่านได้ด้วย ถึงจะเลื่อนขึ้นมาได้ ดังนั้น ในการที่จะเป็น Senior Technician ของสิงคโปร์ จะต้องกินเวลาประมาณ 10 ปี เป็นอย่างน้อย ถึงจะได้เป็นหัวหน้า Lab. นั้น ๆ การที่เขาทำแบบนี้ก็เพื่อที่จะได้มีคนทำงานใน Lab. และรู้ซึ้งในวิชานั้น ๆ จริง ๆ และไม่สามารถที่จะหนีออกไปหางานที่อื่นได้ โดยเฉพาะหนีออกไปนอกประเทศ ซึ่งเขากลัวว่าคนของเขาจะหนีไปทำงานที่อื่น ปีที่ข้าพเจ้าไปนี้ รัฐบาลสิงคโปร์เขาเอาใจพวกเจ้าหน้าที่ ๆ ทำงานของรัฐบาล โดยในเดือนธันวาคมก่อนจะถึง Christmas เขาจ่ายเงินเดือนฟรีให้แก่พวกลูกจ้างที่ทำงานของรัฐบาลอีกคนละ 1 เดือน เขาเรียกว่า 13th Month Pay การที่จะจ่ายนี้ก็ต้องมีข้อแม้ว่าคน ๆ นั้นต้องทำงานเต็มที่ตลอดทั้งปี ไม่มีวันลาป่วย, ลากิจ หรือไม่ไปดูงานนอกประเทศ สิงคโปร์ถึงจะได้รับสิทธิ์นี้

หลังจากปฏิบัติงานใน General Laboratory แล้ว ข้าพเจ้ายังใช้เวลาที่เหลือเข้ารับการอบรมในห้องปฏิบัติการ Chromosomes ด้วย ที่หน่วยนี้มีเครื่องมือที่ทันสมัย และนับเป็นหน่วย Chromosome studies ที่ใหญ่ในแถบกลุ่มประเทศทาง ASEAN ด้วย และได้เข้าชม Central Lab. ของโรงพยาบาล ซึ่งมี Lab. Microbiology, Blood Bank, Hematology, Biochemistry และ Serology และหน่วย Electron Microscope ทราบว่าเจ้าหน้าที่ที่ทำงานใน Lab. ต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว ส่วนใหญ่จะเป็นหัวหน้า Central Lab. เป็นผู้ควบคุม และแจกจ่ายเจ้าหน้าที่ไปตาม Lab. ต่าง ๆ โดยมีแพทย์เป็นหัวหน้าใหญ่ และรองลงมาก็จะเป็น Senior Technician เป็นผู้ควบคุมอีกทอดหนึ่ง สังเกตว่า คนที่ทำงานในแต่ละ Lab. นี้ เขาจะมีความประหยัดมาก เครื่องมือเครื่องใช้ ถึงแม้จะทันสมัยมาก แต่เขาก็ยังพยายามที่จะคิดประดิษฐ์ขึ้นด้วยวัสดุภายในประเทศเอง และก็ใช้การได้ดีด้วย นอกจากนี้ยังรู้จักแก้ไขเครื่องมือเครื่องใช้ให้อยู่ในสภาพที่ใช้งานได้นานที่สุดเท่าที่จะทำได้

ในด้านสถานที่ท่องเที่ยวนั้น ประเทศสิงคโปร์เป็นประเทศที่เล็ก พื้นที่มีน้อย และเป็นเกาะ ดังนั้น พื้นที่ของเขาจึงมีประโยชน์แทบทุกตารางนิ้ว บ้านส่วนใหญ่จะสร้างเป็นแบบแฟลตสูงขึ้นไปเป็นสิบ ๆ ชั้น และที่สำหรับเที่ยวก็เป็นที่ ๆ สร้างขึ้นไม่เป็นไปตามธรรมชาติ มีที่เที่ยวที่ข้าพเจ้าประทับใจมาก คือ Sentosa ไม่ไกลจากที่พักของข้าพเจ้านัก นั่งรถ Bus คนละประมาณ 10 เซ็นต์ เป็นเกาะอยู่กลางทะเล เราจะเดินทางไปถึงเกาะนี้ได้ด้วยเรือยนต์ เสียค่าโดยสารประมาณ 1.25 เหรียญสิงคโปร์ และถ้าไม่อยากเดินทางกลับทางเรือก็มีรถกลางอากาศ (Cable Car) เสียค่าโดยสาร 1.75 เหรียญสิงคโปร์ นั่งโดยใช้รอกไฟฟ้าข้ามผ่านทางทะเล เป็นที่หวาดเสียวดี และมีที่ ๆ ขึ้นไปชมวิว

ทิวทัศน์ของเกาะได้ โดยขับรถยนต์ขึ้นไป ชื่อ "Mount Fabour" ขับรถขึ้นไปเหมือนเราขับรถขึ้นดอยสุเทพ เชียงใหม่นั่นเอง ส่วนมากเขาชอบขับรถขึ้นไปตอนกลางคืน เพราะดูสวยดีกว่ากลางวัน ขึ้นไปเพื่อชมวิว อ่าว อู่ต่อเรือ และอ่าวสำหรับจอดเรือรอบ ๆ เกาะ

สิงคโปร์นับว่าเป็นประเทศที่มีศูนย์การค้ามากที่สุด เราจะซื้อสินค้าได้แทบทุกชนิด สินค้าต่าง ๆ ราคาค่อนข้างแพง เมื่อเทียบกับบ้านเรา สินค้าพวกเครื่องไฟฟ้าและเครื่องสำอางค์จะถูกกว่าบ้านเรา แต่พวกเสื้อผ้าและอาหารค่อนข้างแพง.

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

ย่อและรีวิวเอกสาร

Immunization with a human diploid cell strain of rabies virus vaccine: Two-year results.

Nicholson, K.G., Turner, G.S.. and Aoki, F.Y. J. Infect. Dis. 137 (6) : 783–788, 1978.

Human diploid cell strain vaccine (HDCV) เป็นวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าที่ผลิตจากการเอาเชื้อ rabies virus ไป infect ใน human embryonic lung fibroblast cell culture วัคซีนชนิดนี้เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าให้ immune response ได้ดีกว่า nerve tissue และ duck embryo vaccines ฉนั้นจำนวน dose ที่ใช้ฉีดจึงน้อยกว่า คณะผู้วิจัยนี้ได้ทดลองดูผลของ immune response ต่อ HDCV โดยการฉีดวัคซีน 3 เข็ม วันที่ 0,28 และ 56 ในอาสาสมัคร 77 คน ทาง intramuscular (i.m) และ intradermal (i.d) พบว่ามี antibody response ในอาสาสมัครทุกคนหลังจากการฉีดวัคซีนเข็มแรกหนึ่งเดือน การ response ในแต่ละกลุ่มทั้ง i m และ i d เท่า ๆ กัน ทั้งๆ ที่ i.d ได้รับวัคซีนเพียง 1/10 ของ i m หลังจากเข็มที่สองและสาม antibody response ได้สูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับทาง i.m ซึ่งสูงกว่า i.d อย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 2,3 และ 12 คือมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าประมาณสองเท่า. antibody response ต่อ booster dose vaccine ทาง subcutaneous หรือ i.d ในเดือนที่ 6,12 หรือ 24 เหมือนกันของทั้งสองวิธีการให้ booster dose มี immune response ได้สูงกว่าการไม่ได้ booster dose.

ปกรณ์ ไทยานันท์
วท.ม. (จุลชีววิทยา)

Serologic tests in the diagnosis of systemic candidiasis.

Enhanced diagnostic accuracy with crosses immunoelectrophoresis.

Glew, R.H, Buckley, H R., Rosen, H M., Moellering, Jr., R.C., and Ficher, J.E. Am. J. Med. 64 : 586-591, 1978.

Serologic tests เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้เป็น diagnostic value เพื่อที่จะบอกว่าคนไข้เป็น candidiasis ชนิด colonization หรือ disseminated infection คณะผู้วิจัยได้ทำ serologic test ในซีรั่มของผู้ป่วยทั้งหมด 201

ราย ซึ่งได้รับ parenteral hyperalimentation. โดยการตรวจหา agglutinating และ precipitating antibodies ต่อ Candida albicans จากคนไข้ทั้งหมดนี้พบว่าเป็น fungal colonization 50%, transient fungemia 6% และ disseminated candidiasis 2.5% Aggglutinating antibodies ไม่สามารถใช้เป็น diagnostic value สำหรับแยกคนไข้ว่าเป็น candida colonization หรือ disseminated infection ซึ่งมี sensitivity ≤ 75% และมีpredictive value ≤ 20%. Serum candida precipitins ที่ตรวจหาโดยวิธี double immunodiffusion (DID) มีอยู่ 53 รายที่ให้ผลบวกต่อ DID และใน 53 รายนี้มีอยู่ 5 รายที่เป็น systemic candidiasis จริงๆ นั่นคือมี sensitivity 100% แต่มี predictive value เพียง 9% และเมื่อนำ serum ที่ให้ผลบวกต่อ DID นี้ไปทำ crossed Immunoelectrophoresis (XIE) พบ precipitin band ที่เกิดจากแอนติบอดี ที่ทำปฏิกิริยาต่อ cytoplasmic antigen นอกเหนือไปจาก band ที่เกิดจาก cell wall antigen 9 ราย รวมทั้ง 5 รายที่เป็น disseminated candidiasis นั่นด้วย ดังนั้นการตรวจโดยวิธี XIE โดยดู band ที่เกิดนอกเหนือจาก cell wall antigen มี predictive value 56% และมี sensitivity 100% การตรวจหา serum candida precipitins โดยวิธี DID ซึ่งเป็น sensitive screening test สำหรับตรวจคนไข้ที่เสี่ยงต่อการเป็น systemic candidiasis คือคนไข้ที่ให้ผล negative precipitins โดยวิธี DID บอกได้ว่าไม่เป็น disseminated candidiasis. ถ้าตรวจพบ precipitin bands โดยวิธี XIE ที่นอกเหนือไปจาก cell wall antigens ก็บอกได้ว่าคนไข้นั้นเป็น disseminated หรือ invasive candida infection.

ปกรณ์ ไทยานันท์
วท.ม. (จุลชีววิทยา)

A comparison of isotopic and enzyme-immunoassay for tropical parasitic disease. Voller, A., Bidwell, D.E.. Bartlett, A., & Edwards, R. Trans. Roy. Soc. Hyg. 71: 431-437, 1977.

การศึกษาและเปรียบเทียบการวัดหาแอนติบอดีในโรคพยาธิต่างๆ โดยวิธีใช้เอ็นซายม์-อิมมูโนเอสเส (ELISA) และวิธีราดิโออิมมูโนแอสเส (RIA) พบว่าทั้ง 2 วิธีมีความไวและ reproducibility ใกล้เคียงกัน วิธีการทั้ง 2 อย่างคล้ายคลึงกันในขั้นแรก คือ ติดแอนติเจนไว้กับผิวของ microplate ก่อนแล้วจึงให้แอนติบอดีในซีรั่มของผู้ป่วยมาจับกับแอนติเจนนั้น ขั้นต่อมาแตกต่างกันตรงที่ ในวิธี ELISA ใช้ Alkaline phosphatase labelled sheep antihuman IgG มาจับต่อจากแอนติบอดีของผู้ป่วยดังกล่าวข้างต้น แล้ววัดผลโดยวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นด้วย Spectrophotometer ส่วนวิธี RIA ใช้ ^{125}I-labelled sheep antihuman Ig G มาจับต่อจากแอนติบอดีของผู้ป่วย แล้ววัดผลโดยวัดปริมาณกัมมันตรังสีของส่วนที่ทำปฏิกิริยากัน ผู้เขียนได้ทำการศึกษาในโรค Chaga's โรคเหงาหลับ (Sleeping Sickness), มาเลเรีย. พยาธิใบไม้ในเลือด, และโรคบิดมีตัว แอนติเจนที่ใช้สกัดจาก Trypa-

nosoma cruzi, T. bruci, Plasmodium falciparum, Schistosoma mansoni และ Entomoeba histolytica ตามลำดับ ผลจากการทดลองพบว่าการใช้วิธีทั้ง 2 ในผู้ป่วยเหล่านี้ได้ผลอ่านค่าสูงกว่าในคนปกติมาก และไม่มี Cross reaction ต่อกันและกัน ยกเว้นโรค Chaga's กับโรคเหงาหลับ และโรคบิดมีตัวกับโรคเหงาหลับ ผู้เขียนสรุปว่า การศึกษาด้วย RIA ได้ผลน่าพอใจมากในโรคพยาธิ, ส่วนวิธี ELISA นั้นให้ผลทัดเทียมกัน การที่ไม่ต้องใช้สารรังสีและเครื่องมือวัดรังสี วิธีหลังนี้จึงเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการศึกษา แต่ไม่มีเครื่องมือเครื่องใช้ดังกล่าว

รัตนาภรณ์ เกษมสุทธิ์
วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

Selective uptake of ^{75}Se-selenomethionine by thymona with pure red cell aplasia.

Min, K.W., Waddell, C.C., Pircher F.J., Granville G.E. & Gyorkey F. Cancer 41 : 1323-1328, 1978.

ในผู้ป่วยคนหนึ่งได้เคยรับการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งต่อมไทรอยด์ออก ต่อมาอีก 3 ปี พบก้อนที่ตำแหน่ง mediastinal จึงรักษาด้วย ^{131}I ผู้ป่วยเกิดภาวะผลิตเม็ดโลหิตแดงต่ำมาก (Red cell aplasia) เมื่อทดลองทำ scan โดยใช้ ^{75}Se-Selenomethionine พบว่าก้อนเนื้อนั้นสะสมได้ แต่เมื่อทำด้วย ^{67}Ga-gallium citrate กลับไม่พบว่ามีการสะสม ^{131}I ก็ไม่มีการสะสมเช่นกัน เมื่อผ่าตัดเอาก้อนเนื้อออกมาพบว่าเป็น benign lymphocytic thymoma หลังผ่าตัดพบว่าการผลิตเม็ดโลหิตแดงดีขึ้น สรุปว่าการใช้ ^{75}Se-selenomethionine อาจช่วยในการหา occult thymomas.

กนกวรรณ อุโฆษกิจ
M.Sc.

Pyrogen Reactions Associated with the Infusion of Normal Serum Albumin (Human)

By Steere A.C. Transfusion 18:102, 1978.

ในเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 1974 ได้พบว่าผู้ป่วย 8 คน ในโรงพยาบาล 3 แห่ง มีอาการไข้ขึ้นเนื่องจากได้รับ 25 % Normal Serum Albumin จากชุดเดียวกัน อาการนี้เป็นที่น่าสังเกตเพราะว่า แพทย์หรือพยาบาลคนเดียวกันเห็นว่าผู้ป่วยหลายคนมีอาการเช่นนี้เกิดขึ้นซ้อน ๆ กัน หรือเพราะว่า คนไข้คนเดียวได้รับหลาย vial แล้วมีอาการติดต่อกัน albumin ใน 3 vials ที่เหลือจากให้กับผู้ป่วยแล้วมีอาการเช่นนี้ พบว่ามีความเข้มข้นของ endotoxin 4,16 และ 32 ng/ml. และใน 22 vial จาก recalled supplies มีความเข้มข้นเป็น 4 ng/ml. (range 2-64) หาโดยวิธี Limulus amebocyte lysate แต่เอาไปฉีดในกระต่ายเพื่อดูอาการไข้อีกด้วย ในการศึกษาเพื่อหาว่าวิธี Limulus ดีในการทำ quality control ผู้ป่วยจะต้องได้รับการตรวจอุณหภูมิทุกชั่วโมงระหว่างการให้ albumin และที่เหลือเอาไปตรวจสอบโดยวิธี Limulus การให้ albumin 433 ขวดใน 662 ขวด ให้ผลบวกและ 311 ขวด ในจำนวนนี้ (45%) จะมีความเข้มข้นของ endotoxin

4–64 ng/ml แต่ไม่มีผู้ป่วยคนไหนมีอาการเลย เพราะว่ามีการจำกัดของ rabbit pyrogen และ Limulus test การหา pyrogenic lots ต่อ ๆ ไปต้องขึ้นกับความควบคุมดูแลของทางโรงพยาบาล และรายงานอาการที่น่าสงสัยด้วย

สุรภา เดชะ
วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

Neutrophilic Hypersegmentation as An Indicator of Incipient Folic Acid Deficiency By B. Terence and S. Lawrence Am. J. Clin. Pathol. 63 : 263, 1977.

Torence และ Lawrence ได้หาความสัมพันธ์ระหว่าง neutrophilic hypersegmentation กับภาวะการขาด folic acid เขาพบว่าเมื่อร่างกายขาด folic acid จะทำให้เกิด neutrophilic hypersegmentation ขึ้น ซึ่งหาได้จากค่าจำนวน lobe เฉลี่ยของ neutrophils ที่มากกว่า 3.5 หรือค่า segmentation-index มากว่า 30% เขาพบว่าในคนที่ไม่มีอาการของโลหิตจางหรือการเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ที่เกิดจากการขาด folic acid เมื่อตรวจพบ neutrophilic hypersegmentation จะชี้ให้เห็นว่าคนนั้นเริ่มจะขาด folic acid

ดำรงค์ พิณตานนท์
วท.ม.

Factors Affecting Measurement of Total Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum, Especially Wavelength Accuracy. J.A. Lott, K. Turner, and J, Scott. Clin. Chem, 24 ; 938–940, 1978.

วิธีที่ใช้วัดทางปริมาณวิเคราะห์ serum alkaline phosphatase ตาม Clin. Chem. 21, 1988 (1975) มีความผิดพลาดได้ง่ายในการตั้งความยาวคลื่นของเครื่อง spectrophotometer เช่นถ้าผิดไป 3 nm. อาจทำให้ค่าต่ำไปถึง 23% สารที่เกิดจากปฏิกิริยา (4–nitrophenol) สามารถเตรียมเป็นสารบริสุทธิ์และใช้ในการตรวจสอบทั้งความยาวคลื่น และ absorbance ได้ ดังนั้นจึงควรใช้ค่า molar absorptivity ของ 4-nitrophenol ที่หาได้จากเครื่องมือในการคำนวณ alkaline phosphatase activities.

เกรียงศักดิ์ อิ่มใจ
วท.ม. (การสอนเคมี)

วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่
Bulletin of Chiang Mai
Associated Medical Sciences

Vol. 11 No. 3
September 1978

« ข่าวในวงการ »

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

จากประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี เรื่อง การแบ่งส่วนราชการในมหาวิทยาลัย ขอน แก่น ลงวันที่ 30 พฤษภาคม 2521 (ราชกิจจานุเบกษาเล่มที่ 95 ตอนที่ 72 วันที่ 18 กรกฎาคม 2521) ประกาศให้ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นคณะ โดยมีส่วนราชการดังนี้

1. สำนักงานเลขานุการคณะฯ
2. ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี
3. ภาควิชาเคมีคลินิค
4. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิค
5. ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค

นับว่าเป็นคณะเทคนิคการแพทย์แห่งที่ 3 ของประเทศไทย ต่อจาก 2 แห่งแรก คือ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ตามลำดับ

ตริตาภรณ์มงกุฎไทย

1. นายสวัสดิ์ ลังการ์สิทธิ์
2. นายอุดมศักดิ์ เห่วซึ่งเจริญ

จัตุรถาภรณ์ช้างเผือก

1. นายเกรียงศักดิ์ อิ่มใจ
2. นายดำรงค์ พิณตานนท์
3. นายสุชาติ ศิริทูล
4. นางสาวนันทยา วัยวัฒนะ
5. นางสาวบุญพะเยาว์ เลาหะจินดา

เบญจมาภรณ์มงกุฎไทย

1. นายถวิล เรนทร

เลื่อนระดับเงินเดือนข้าราชการ

ข้าราชการมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เป็นนักเทคนิคการแพทย์ ผู้ได้รับการเลื่อนระดับเงินเดือนจากการสอบคัดเลือก ตามประกาศของ อ.ก.ม. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ลงวันที่ 14 กันยายน 2521 มีดังนี้

ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 4

1. นายรัศมี แก้ววิชิต
2. นายสุชาติ บั่นจัยสีห์

ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 5

1. นายจตุพร ทองทาบ

ข้าราชการกลับจากต่างประเทศ

1. อาจารย์รุจาภา นิมสังข์ ภาควิชา

เคมีคลินิคคณะเทคนิคการแพทย์ ซึ่งได้รับอนุมัติให้ไปฝึกอบรมทางด้าน Clinical Chemistry (Laboratory) ที่ Queen Elizabeth Medical Center, สหราชอาณาจักร์ด้วยทุนองค์การอนามัยโลก (W.H.O.) เป็นเวลา 1 ปี 3 เดือน (3 เดือนแรกอบรมภาษาอังกฤษ) ตั้งแต่วันที่ 3 มิถุนายน 2520 นั้น บัดนี้ครบกำหนดเวลาและได้เดินทางกลับมาปฏิบัติหน้าที่ตามปกติแล้ว ตั้งแต่วันที่ 29 สิงหาคม 2521

2. อาจารย์วารุณี คุณาชีวะ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งได้รับอนุมัติให้เดินทางไปฝึกอบรมทางด้านห้องปฏิบัติการคลังเลือด ณ National Blood Transfusion center ประเทศอังกฤษ ด้วยทุนองค์การอนามัยโลก (W.H.O.) มีกำหนดระยะเวลา 1 ปี 3 เดือน (3 เดือนแรกเรียนภาษาอังกฤษ) ทั้งนี้ตั้งแต่วันที่ 30 มิถุนายน 2520 นั้น บัดนี้อาจารย์วารุณี คุณาชีวะ ได้เสร็จสิ้นการฝึกอบรมดังกล่าว และกลับเข้าปฏิบัติงานตามปกติแล้ว ตั้งแต่วันที่ 25 กันยายน 2521

ประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์

ภาควิชาเคมีคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ร่วมกับชมรมนักเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ และบริษัท สยามเมดิโก ซัพพลาย จำกัด ได้จัดการประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 2 เรื่อง "ความสำคัญของการตรวจหา Electrolyte ในการวินิจฉัยโรค" ขึ้น ณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 25 กันยายน 2521 การประชุมได้สำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี โดยมีสมาชิกและผู้สนใจในเขตจังหวัดภาคเหนือ รวมทั้งนักศึกษาเข้าร่วมลงทะเบียน ประชุมจำนวน 84 คน สำหรับการประชุมวิชาการทางเทคนิคการแพทย์ ครั้งที่ 3 ที่จะจัดในอนาคตอันใกล้นี้ ได้รับทราบจากบริษัท สยามเมดิโก ซัพพลาย จำกัดว่า จะเป็นเรื่องทาง Hematology.

ข้าราชการเดินทางไปต่างประเทศ

อาจารย์มาลินี เชาวพันธุ์ ภาควิชาคลินิคัลไมโครสโคปี้ คณะเทคนิคการแพทย์ ได้รับทุน ASEAN ให้ไปฝึกอบรม ทางด้าน Laboratory Methods in the Prevention of Hyper bilirubinaemia in New born infants particularly screening Method for G-6-PD Erythrocytes ณ ประเทศสิงคโปร์ มีกำหนด 3 เดือน ทั้งนี้ตั้งแต่วันที่ 2 ตุลาคม 2521-วันที่ 1 มกราคม 2522.

ดัชนีโฆษณา

บริษัท เฮ็กซ์ไทย จำกัด (Riedel–de Haen) ปกหน้าด้านใน

บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ จำกัด

บริษัท สยามเมดิโก ซัพพลาย จำกัด

บริษัท สยามเมดิโก ซัพพลาย จำกัด

บริษัท สยาบเมดิโก ซัพพลาย จำกัด

บริษัท ไวท์กรุ๊ป จำกัด

บริษัท เฮ็กซ์ไทย จำกัด

ห้างหุ้นส่วนจำกัด รัชมอร์

บริษัท โรนิม มาร์เก็ตติ้ง เซอร์วิส (ประเทศไทย) จำกัด ใบแทรก

บริษัท โรนิม มาร์เก็ตติ้ง เซอร์วิส (ประเทศไทย) จำกัด ใบแทรก

บริษัท เฮ็กซ์ไทย จำกัด ใบแทรก

บริษัท ดูเม็กซ์ จำกัด ใบแทรก

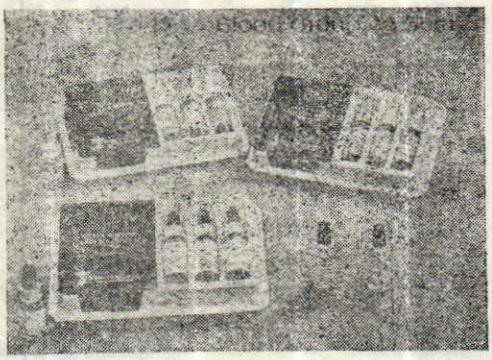
แก้คำผิด

1. เบอร์โทรศัพท์ของบริษัท เจ๊บเซ่น & เจ๊สเซ่น (ประเทศไทย) จำกัด ที่ถูกคือ 252 – 0135 – 9
2. วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ ปีที่ 11 เล่มที่ 3, ปี 2521.
   - หน้า 113 ชื่อเรื่อง Comparison of percentage of T–Lymphocyte with number of lymphocyte in Human peripheral blood obtained by two different methods; Dextran floatation and Ficoll–Hypaque separation technique มีความผิดพลาดหลายตอน จึงนำเรื่องนี้พิมพ์ใหม่ ในวารสารเล่มนี้ หน้า 15 ถึง 20
   - หน้าที่ 129 เรื่อง A Comparative study of various substrates for the detection of ANF รูปต่อจากหน้าที่ 132 ไปอยู่หน้าที่ 118.

Wellcome Reagents Limited
Wellcome Research Laboratories
Beckenham Kent England BR3 3BS

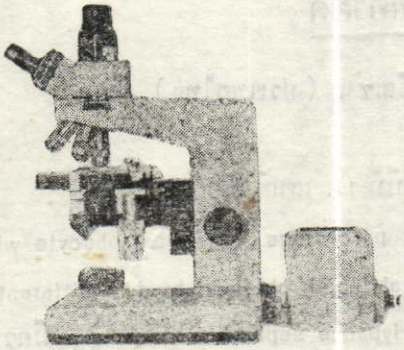
Serving Laboratory Medicine Worldwide

ORTHO DIAGNOSTICS INC
Raritan, New Jersey 08869 U.S.A.



ALSO AVAILABLE.

- Clinical Chemistry
- Haematological Reagents
- Immunological Reagents (Immuno Precipitating Sera, Prepurex pregnancy test, Salmonella O Antisera, Salmonella H Antisera)
- Microbiological Reagents (Shigella Agglutinating Sera, Streptococcal Grouping Sera, Stained Suspension, Anti-Streptolysin O Reagents, Bacteriological Culture Medium, Animal Sera)
- Radio Immunoassay Reagents
- Tissue Culture Media and Solutions
- Venereal Disease Diagnostic Reagents (Gonococcus Antigen, VDRL Antigen)
- Veterinary Reagents
- Viral Diagnostic Reagents



The following are trademarks of Ortho Diagnostics:

- AFFIRMAGEN Reagent Red Blood Cells (Human)
- ANTIGRAM Antigen Profile
- FIBRINDEX Thrombin (Human)
- GRAVINDEX Slide Test for Pregnancy
- HAPINDEX Counterelectrophoresis Test for detecting Hepatitis Associated Antigen (Hepatitis B Antigen)
- IDENTIGEN Reagent Red Blood Cells (Human)
- MONOSPOT Slide Test for Infectious Mononucleosis
- ORTHO Abnormal Plasma Coagulation Control
- ORTO A_2 Cells
- ORTHO Anti-Human Serum
- ORTHO Bovine Albumin
- ORTHO Brain Thromboplastin
- ORTHO Coombs Control
- ORTHO Harris Hematoxylin Modification
- ORTHO Plasma Coagulation Control (Human Plasma)
- RARICELL Reagent Red Blood Cells (Human)
- RhoGAM Rh_o (D) Immune Globulin (Human)
- SELECTOGEN Reagent Red Blood Cells (Human)
- SICKLEDEX Tube Test for Hemoglobin S
- THROMBOFAX Reagent (Partial Thromboplastin)
- Activated THROMBOFAX Reagent (Partial Thromboplastin with Activator)

BERLI JUCKER CO. LTD.
Hospital & Scientific Section
PANUNEE BLDG. 518/3 PLOENCHIT ROAD.
TEL. 2510393, 2529785, 2525878, 2531105, 2525603