Vacuette News greiner bio-one

ฉบับที่ 4 เดือนตุลาคม - ธันวาคม 2545

ที่ปรึกษา
คุณสมพงษ์ จรุงกีรติวงศ์
คุณอมราภรณ์ จรุงกีรติวงศ์
คุณจิโรจน์ เตชะวณิชย์
บรรณาธิการ
คุณดุสิต จินดากุล
กองบรรณาธิการ
คุณสมชาย มงคลรัตนาสิทธิ์
คุณรจนา คล้ายพุก
คุณสรัญญา มงคลรัตนาสิทธิ์
คุณสุมาลี ศรีอำนวยไชย
คุณเรืองรัตน์ จันทฤทธิ์

กล่าวทักทาย

*สวัสดีครับ Vacuette News ฉบับที่ 4 นี้มีการเพิ่มเนื้อหาทางวิชาการในงานจุลชีววิทยา เนื่องจากห้องปฏิบัติการเป็นจำนวนมากให้ความสนใจในการควบคุมคุณภาพงานของจุลชีววิทยา หลายท่านได้สอบถามถึง Sheep Blood Cells **ในการเตรียม** Blood Agar Plates เข้ามายังกองบรรณาธิการเป็นจำนวนมาก*

ก่อนอื่นต้องขอแสดงความยินดีผู้ได้รับรางวัล 3 ท่าน จากการสุ่มจับฉลากผู้ตอบคำถามถูกต้อง สำหรับเนื้อหา Vacuette News ประกอบด้วย

- *How to keep a sample " fresh and stored " in the laboratory.*
- *5% Sheep Blood Agar.*
- ***ฉลาดใช้บัตรเครดิต***
- ***รายชื่อผู้ได้รับรางวัล 3 ท่าน***
- ***คำถามร่วมสนุกชิงรางวัล เช็คของขวัญ 1,000 บาท 3 รางวัล***

หากท่านใดมีข้อสงสัยหรืออยากให้ทางกองบก.นำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับ Blood Collection System , Pre analytical Process และจุลชีววิทยา สามารถเสนอแนะมาได้ เพื่อที่จะได้นำมาจัดพิมพ์หรือจัดทำลงในฉบับถัดไป

บรรณาธิการ

ผู้พิมพ์ : บริษัท กรุงเทพ อินเตอร์ โปรดักส์ จำกัด 7/75-76 หมู่ 11 ถนนรามอินทรา แขวงคันนายาว เขตคันนายาว กรุงเทพฯ โทร. 0-2948-6906-8 โทรสาร 0-2948-6909
Email : bip@clickTA.com

How to keep a sample "fresh and stored" in the laboratory.

10 rules and some recommendations

1. The procedure is governed by the stability of the constituents of the sample. The most important causes for alterations to the quality of specimen are :

- Metabolism of the blood cells
- Evaporation /sublimation
- Chemical reactions
- Microbiological decomposition
- Osmotic processes
- Effect of light
- Gas diffusion

2. Rapid transport and short storage times improve the reliability of laboratory results.
3. Specimens and samples are preserved longer the cooler they stored (but note exceptions!).
4. Specimens and samples should always be stored in closed vessels (evaporation!)
5. The danger of evaporation also exists in refrigerators (condensation of moisture on the cooling elements).

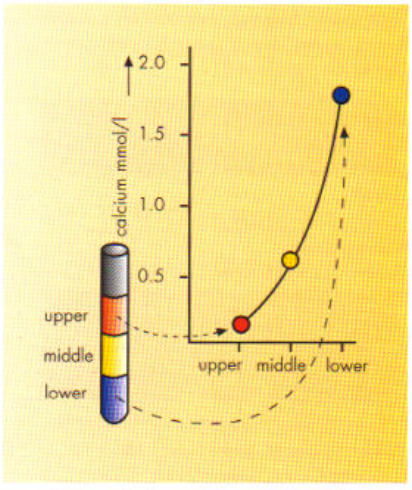


Fig.1 Formation concentration gradients of calcium in plasma sample after rethawing without mixing

6. Storage problems are reduced if disposable sampling systems are used.
7. Separating agents (e.g. gel separators) improve the serum/plasma yields and enable serum to be left in the original tubes above the blood (1).
8. Avoid shaking the sample vessels (pneumatic tube dispatch systems.): risk of hemolysis.
9. Always store sample vessels containing blood vertically; the clotting procedure is accelerated. Label infectious material and handle it with particular care.
10. Label infectious material and handle it with particular care.

8 special rules and some more useful recommendations

1. Avoid storing of whole blood. Information on sensitive analytes is given in the " list of analytes and leaflets". Blood samples should reach the laboratory within 45 min of collection in order to ensure that centrifugation and separation of the sample is carried out within 1 hour (2,3,4)

2. Avoid glycolysis to keep glucose, lactate and pH stable. Glycolysis can be avoided by the addition of an inhibitor in conjunction with an anticoagulant (5).

3. Avoid the effect of light otherwise there will be a fall in the values of bilirubin, vitamin C, porphyrins, creatine kinase (CK) and folic acid.

4. Reduce contact with air as far as possible. If this is not done, evaporation/sublimation will result in an apparent increase in the concentration/activity of all non-volatile components. This is particularly the case when the volume of the sample is relatively small and the surface area is relatively large.

5. Whole blood should not be stored in the refrigerator. When urine is cooled, salts may precipitate out of the solution (calcium and magnesium phosphate, uric acid).

6. For certain analytes, the specimens/sample should not be deep frozen. Failure to observe this can result in deviating results for the following analytes:

Table 1 Examples of blood and urine constituents which should not be stored frozen

Sample	*Analytes*
Serum/plasma	*Lipoprotein electrophoresis*
	Lipoprotein X
	Apolipoprotein A-I and B
	LDL-cholesterol (prevented by the addition of glycerol)
	*Fibrin monomer positive plasma**
EDTA-Blood	*Hematology*
Urine	*IgG*
	Sediment
	Uric acid (precipitations!)

*Negative test result, prolonged PTT, shortened thrombin time, shortened reptilase time.

7. Correct thawing. A very common source of error is the inadequate mixing of deep-frozen samples after they have thawed. Concentration gradients are produced during thawing as the concentrated solution first melts and then runs down the sides of the vessel (see Fig.1)

After thawing, the sample should therefore be inverted several times, avoiding the formation of foam. Look for undissolved material and, if necessary bring into solution by careful warming.

8. Store sample after analysis in such a way as to permit the confirming of results, checking the identity of sample or performing additional tests for medical of legal reasons:

Table 2 Recommended storage time and conditions for analytical sample

Sample for	Storage time	Temperature
Clinical Chemistry:	1 week	Refrigerator
Immunology:	1 week	Refrigerator
Hematology:	2 day	Room temperature
Coagulation:	1 day	Refrigerator
Toxicology:	6 weeks	Refrigerator
Blood grouping:	1 week (at least)	Refrigerator

References

1. Kupke IR. Evaluation of the polyester gel barrier microtainer Clin Chem 1997;33: 1468-70
2. Einer G, Zawta B. Praanalytikfibel. Heidelberg. Leipzig: Barth-Verlag, 2md ed. 1991.
3. Laessig RH, Indriksons AA, Massemer DJ, Paskey AT, Schwarz TH. Changes in serum chemical values as a result of prolonged contact with the clot. Am J Clin Path 1976;66: 598-604.
4. NCCLS, MI - A4 Eavcuated Tube and Additive for Blood Specimen Collection - Fourth Editior, Approved Standard.
5. W.G. Guder, S. Naryanan, Sample : Form the Patient to the Laboratory, 1996.

5% SHEEP BLOOD AGAR

ในเม็ดเลือดแดงจะประกอบด้วย Hemoglobin ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ เหล็ก (Iron) เหล็กเป็นสารที่แบคทีเรียหายากในสิ่งแวดล้อมทั่วไป ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียถูกเพาะเลี้ยงบน Sheep Blood Agar (SBA) ก็พัฒนาตัวเองเพื่อที่จะใช้เหล็ก โดยการสร้างสาร Hemolysin ออกมาสลายเม็ดเลือดแดง เพื่อให้เม็ดเลือดแดงปล่อยเหล็กออกมาให้แบคทีเรียนำไปใช้

Sheep Blood Agar เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย มีคุณสมบัติเป็น

1. Enriched Media โดยมี Sheep Blood เป็นแหล่งให้ Growth Factors สำหรับ Common Fastidious Bacteria

2. Non Selective Media

3. Differential Media เช่นในการแยกชนิดเบื้องต้น (Preliminary Identification) ของ Streptococci โดยอาศัยคุณสมบัติของการเกิด Hemolysis ของเม็ดเลือดแดงบน Sheep Blood Agar แบคทีเรียที่เจริญเติบโตบน Sheep Blood Agar จะให้สาร หรือ Products ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ Sheep Blood Agar เช่น Streptococcus pyogenes จะสร้างสาร Streptolysin O และ S ออกมารอบ Colony ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Enzyme ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้สมบูรณ์

คุณสมบัติของ Streptolysin O เป็น Oxygen-labile และ Antigenic Extracellular Protein

คุณสมบัติของ Streptolysin S เป็น Oxygen –stable และ Non-antigenic เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้มีการแตกสลายของเม็ดเลือดแดง (Hemolytic Toxin)

ปัจจุบันการเตรียม Blood Agar Plates NCCLS แนะนำให้ใช้ Defibrinated Sheep Blood หรือ Horse Blood ไม่แนะนำให้ใช้ Human Blood ถึงแม้ว่าจะหาได้ง่าย เพราะ Human Blood มีข้อเสียหลายประการ เช่น

1. Antibodies และยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial agents) ใน Human Blood จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือให้ผลการเกิด Hemolysis ที่ผิดพลาดไป (False Hemolytic Reactions)

2. Human Blood อาจมี Citrates และ Glucose ไปรบกวนการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- Citrate สามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด เช่น Staphylococci, Anaerobic cocci บางชนิด และ Streptobacillus
- Glucose อาจไปรบกวนการเกิด Hemolysis ได้ โดยไปยับยั้งการสร้าง Hemolysin ของ Streptococci บางชนิด

3. Human Blood มีโอกาสปนเปื้อนไวรัส เช่น HIV, Hepatitis A, B และ C

4. ผิดวัตถุประสงค์ของผู้บริจาคโลหิตที่ต้องการให้นำโลหิต หรือส่วนประกอบของโลหิตไปช่วยเหลือชีวิตของผู้ป่วย

ห้องปฏิบัติการที่ใช้ Human Blood จากสภากาชาดไทยมาเตรียม Blood Agar Plates โดยทั่วไปมักจะนำ Human Blood ที่หมดอายุแล้วมาเตรียม Blood Agar มีสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ เลือดที่เรานำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เป็นแหล่งให้สารอาหาร (Nutrients) และ Growth Factors แก่แบคทีเรีย ทำให้เราจัด Blood Agar Plates เป็น Enriched Media ดังนั้นการใช้ Human Blood ที่หมดอายุ แล้วอาจมีคุณสมบัติไม่ครบตามจุดประสงค์ของการเติมเลือด และหากเลือดที่หมดอายุแล้วเกิด Hemolysis ไปบางส่วนก็จะมีผลต่อการอ่าน Hemolysis ได้

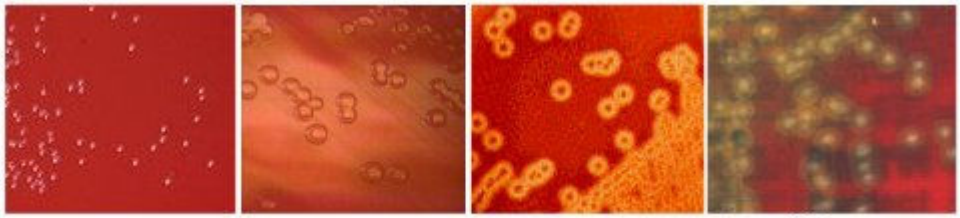
หากห้องปฏิบัติการนำ Human Blood จากสภากาชาดไทยที่ยังไม่หมดอายุมาเตรียม Blood Agar Plates ก็จะมีผลกระทบจากการปนเปื้อน Virus, Antibodies, Antimicrobial agents และ Inhibitory Substances มีผลกระทบต่อการเกิด Hemolysis บน Blood Agar

เราน่าจะพิจารณาว่า Human Blood จากสภากาชาดไทย น่าจะเก็บไว้สำหรับช่วยชีวิตผู้ป่วย ตามวัตถุประสงค์ของผู้บริจาคโลหิต ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งคงเคยพบปัญหาการขาดแคลนเลือดในการช่วยชีวิตผู้ป่วย ดังนั้น หากห้องปฏิบัติการในแผนกจุลชีววิทยาทราบถึงคุณสมบัติของเลือดที่ NCCLS แนะนำให้นำมาเตรียม Blood Agar Plates ว่าควรเป็นเลือดม้า หรือ แกะ ก็สามารถลดการใช้ Human Blood จากสภากาชาดไทยที่ยังไม่หมดอายุมาเตรียม Blood Agar หากทั้งประเทศไทยมีห้องปฏิบัติการที่เปิดบริการแผนกจุลชีววิทยา 500 แห่ง ที่ใช้ Human Blood หากเปลี่ยนมาใช้ Sheep Blood แทน Human Blood ตาม NCCLS แนะนำ จะทำให้เรามี Human blood ไว้ช่วยเหลือชีวิตผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอีก 500 Units

คุณสมบัติของ Sheep Blood สำหรับการเตรียม Blood Agar Plates

1. เลือดแกะต้องมีคุณภาพที่ดีมาจากแกะที่ควบคุมการเลี้ยงและสมบูรณ์ ทำให้มีสารอาหารครบถ้วนเหมาะสมในการเจริญเติบโตของจุลชีพ
2. ปราศจากยาปฏิชีวนะ หรือ Inhibitory Substances ที่จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ หรือการสร้าง Hemolysin ของแบคทีเรีย
3. เมื่อนำไปเตรียม Blood Agar Plates สามารถอ่าน Hemolysis Zone ได้ถูกต้อง และชัดเจน โดยการเพาะเชื้อในกลุ่ม E.coli, S.aureaus, S.pneumoniae และ S.pyogenes
4. ปราศจากเชื้อ (Sterile Sheep Blood)
5. ระบุวันหมดอายุ

ชนิดของ Hemolysis บน Sheep Blood Agar เมื่อ incubate ที่อุณหภูมิ 35 ºC เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง โดยการวัดผล Hemolysis รอบ Colony



1. Beta-Hemolysis (Complete Hemolysis) จะพบลักษณะ clear zone รอบ Colony แบคทีเรีย เนื่องจากเกิดการสลายของเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ เช่น Streptococcus pyogens
2. Alpha-Hemolysis (Partial Hemolysis) จะพบลักษณะ Greenish Colored Zone รอบ Colony แบคทีเรีย เนื่องจากการสลายของเม็ดเลือดแดงบางส่วน จะเกิดปฏิกิริยา Reduction ของ Hemoglobin ไปเป็น Methemoglobin เช่น Streptococcus sangius
3. Gamma-Hemolysis (No Hemolysis) ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ media, ไม่เกิดการสลายของเม็ดเลือดแดง, ไม่พบ Zone รอบ Colony เช่น Streptococcus salivarius

การควบคุมคุณภาพการผลิต 5 % Sheep Blood Agar

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาเตรียมต้องเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) ไม่เก็บในที่ชื้น และไม่โดนแสงแดดโดยตรง
2. สีของ Sheep Blood Agar Plate หลังเตรียมเป็นสีแดงสว่างของเม็ดเลือดแดง (Bright Blood Red and Opaque)
3. ทำการเพาะเชื้อในกลุ่มตามตารางที่ 35 ºC อ่านผลภายใน 18-24 ชั่วโมง

Organism	*ATCC*	*Growth*	*Hemolysis*
Escherichia coli	25922	+	No hemolysis
Staphylococcus aureus	25923	+	Beta Hemolysis
Streptococcus pncumoniae	6305	+	Alpha Hemolysis
Streptococcus pyogenes	19615	+	Beta Hemolysis

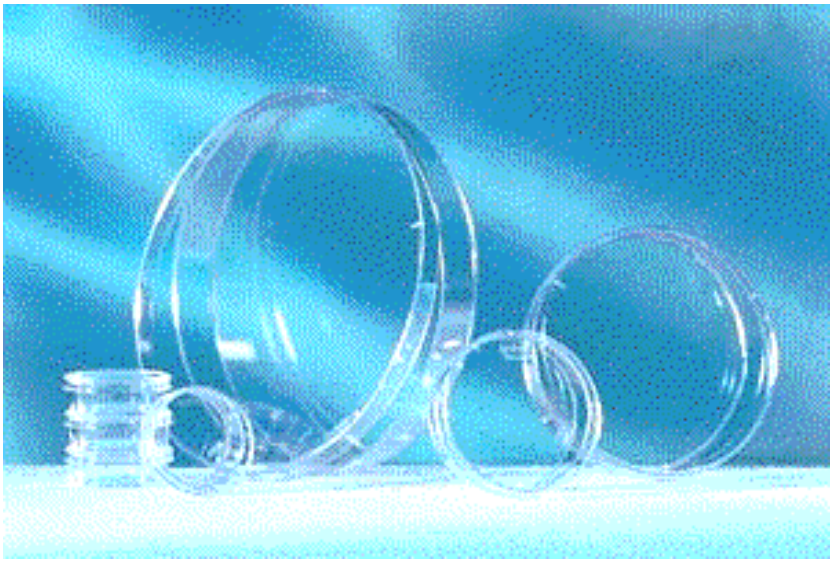
ข้อควรระวังในการอ่านผล Hemolysis บน Blood Agar Plates

1. เลือดที่ใช้ในการเตรียม Blood Agar Plates คือ เลือดม้าและ แกะ
2. อ่านผล Hemolysis ภายใน 24-48 ชั่วโมง หลัง Incubate Plates ที่ 35 °C
3. อ่านผล Hemolysis โดยสังเกตดูรอบ Colony ของแบคทีเรียไม่ใช่ใต้ Colony ของแบคทีเรีย (Surrounding the colony not under the colony) ปัญหาที่พบผิดพลาดบ่อยในการอ่านผล Hemolysis คือ อ่านผลโดยดูสีของ Colony แบคทีเรีย (A common mistakes is to look at the color of the bacteria rather than the agar)
4. การอ่านผล Hemolysis ภายหลัง 48 ชั่วโมง หลัง Incubate ที่ 35 °C จะพบ Non Specific เช่น ในปฏิกิริยาของ Enterococcus faecalis บน 5 % Sheep Blood Agar ถ้าอ่านผล Hemolysis ที่ถูกต้องภายใน 48 ชั่วโมง จะอ่านได้ Gamma-Hemolysis แต่หากอ่านผล Hemolysis เกิน 48 ชั่วโมง จะพบ Slight green บน Sheep Blood Agar ใต้ Colony ทำให้การอ่านผล Hemolysis ผิดพลาดไปจาก Gamma Hemolysis ▶ Alpha Hemolysis

References

1. Cown and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria Third Edition 1998
2. NCCLS 1990 Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media Approved Standard vol 10 No. 4 NCCLS Document M22-A
3. USP XXIV (1999)
4. European Pharmacopoeia III (Addendum 1999)
5. Van Scoy R.E. Culture – Negative Fndocar Ohtis–Mayo (lin Proc, 1982, 5713)

Petri dish



- Broad choice of sizes and designs
- Can be filled on semi and fully automated equipment
- Unvented, single and triple vented versions available
- Heavy design available for high temperature agars

Product Number	**Product Name**
633180	Petri dish, with triple vents 90mmx16 mm
Qty/bag	20pcs/bag
Qty/case	480pcs/Carton

Product of Greiner bio-one, Germany

จัดจำหน่ายโดย...

บริษัท กรุงเทพ อินเตอร์ โปรดักส์ จำกัด
7/75-76 หมู่ 11 ถนนรามอินทรา แขวงคันนายาว
เขตคันนายาว กรุงเทพฯ
โทร. 0-2948-6906-8 โทรสาร 0-2948-6909

Money Tips

ฉลาดใช้บัตรเครดิต

1. ทำงบค่าใช้จ่ายประจำเดือน โดยแบ่งออกเป็น 2 คอลัมน์ คอลัมน์แรกเขียนรายการค่าใช้จ่าย คอลัมน์ที่สองเขียนรายได้หลังหักภาษี เมื่อนำค่าใช้จ่ายมาเปรียบเทียบกับรายได้ คุณจะเห็นทันทีว่าแต่ละเดือนคุณสามารถก่อหนี้ได้แค่ไหน

2. วิธีที่ดีที่สุดในการสร้างกรอบการใช้จ่ายให้กับตัวเองก็คือ การยืมเงิน หรือการใช้เงินล่วงหน้าที่เราเห็นเป็นยอดคงค้างในบัญชีบัตรเครดิตภายในวงเงินที่คุณสามารถใช้คืนได้ ลองไตร่ตรองดูว่าในแต่ละเดือนคุณสามารถใช้เงินได้ในจำนวนเท่าไร จากนั้นจึงค่อยให้เครดิตตัวเองตามจำนวนนั้น กฎทั่วไปก็คือคุณควรจำกัดยอดของการใช้บัตรเครดิตแต่ละเดือนไว้ที่ 20 % ของรายได้หลังหักภาษี

3.ถ้าไม่แน่ใจในนิสัยการใช้เครดิตของตัวเอง คุณควรตัดปัญหาแต่ต้นลมด้วยการจำกัดตัวเองโดยใช้บัตรเครดิตเพียงใบเดียว

4. ในกรณีที่ใช้บัตรเครดิตหลายใบควรพิจารณาวันจัดยอดของบัตรแต่ละใบ เพื่อให้การใช้บัตรเครดิตเกิดประโยชน์สูงสุดในเรื่องระยะเวลาปลอดหนี้

5. วิธีการใช้บัตรเครดิตที่ฉลาดที่สุดและได้ประโยชน์สูงสุด คุ้มค่ากับค่าธรรมเนียมที่ต้องจ่ายในแต่ละปีก็คือ ต้องพยายามทำให้บัญชีบาลานซ์ในทุกเดือน อย่าให้มียอดหนี้ค้างชำระจากเดือนก่อนเป็นอันขาด

6. จำไว้ว่าอัตราดอกเบี้ยที่เกิดจากการใช้สินเชื่อหมุนเวียน คือ มียอดหนี้ค้างชำระจากเดือนก่อน ๆ เป็นอัตราดอกเบี้ยที่โหดที่สุดเท่าที่คุณเคยรู้จัก

7. ต้องมั่นใจว่าการใช้บัตรเครดิตของคุณจะไม่ทำให้เกิด "ค่าปรับ" ขึ้นไม่ว่ากรณีใด ๆ

8. อ่านรายละเอียดต่างๆ ให้ถ้วนถี่

9. ถ้าคุณเป็นนักช็อปที่ไม่อาจหักห้ามใจตัวเองได้ และมักทำผิดเงื่อนไขการชำระเงินติดต่อกันมานาน คุณยังไม่ควรใช้บัตรเครดิตจนกว่าจะเคลียร์หนี้สินเก่าได้

10. หากละเลยการชำระหนี้อย่าปล่อยให้ต้องเดินเข้าสู่กระบวนการทางศาล เพราะจะทำให้เครดิตของคุณถูกทำลาย ทางออกคือ ต่อสู้กับความจริงด้วยการเผชิญหน้าร่วมแก้ปัญหากับธนาคารเจ้าของบัตร

คำถามประจำฉบับ

รางวัลเช็คของขวัญ 1,000 บาท 3 รางวัลสำหรับผู้ตอบคำถาม Vacuette News ฉบับที่3, กรกฎาคม - กันยายน 2545

1. คุณนฤมล แทนทำนุ ศูนย์ทดสอบวัคซีน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล
2. คุณสุรศักดิ์ อินทนี ห้องปฏิบัติการ รพ.ไทยนครินทร์
3. คุณสรวงภรณ์ อุสาหะ ห้องปฏิบัติการ รพ. สมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา

ท่านสามารถร่วมสนุกโดยการตอบคำถามและลุ้นรับของรางวัล คือ

- **เช็คของขวัญ 1,000 บาท 3 รางวัล** ส่งคำตอบมาทาง
  1. Fax 0-2948-6909
  2. หรือไปรษณีย์มาที่ คุณ ดุสิต จินดากุล
     บริษัท กรุงเทพ อินเตอร์ โปรดักส์ จำกัด
     7/75-76 หมู่ 11 ถนนรามอินทรา แขวงคันนายาว เขตคันนายาว กรุงเทพฯ 10230
  3. Email : bip@clickTA.com

ภายในวันที่ 29 พฤศจิกายน 2545 หากมีผู้ตอบถูกมากกว่า 3 ท่าน จะตัดสินโดยการจับฉลาก

คำถามประจำฉบับ

1. NCCLS แนะนำให้ใช้เลือดชนิดใดในการเตรียม Blood Agar

เฉลยคำถาม Vacuette News ฉบับที่ 3 ของเดือนกรกฎาคม - กันยายน 2545

1. **ชนิดของ Plasma ที่ใช้ในงาน Coagulation Testing มี 3 ชนิด คือ**
   1. Platelet-rich plasma
   2. Platelet-poor plasma
   3. Platelet-free plasma

   ที่มาข้อมูล : .W.G. Guder, S. Narayanan, Sample : From the Patient to the Laboratory, 1996
2. **ข้อดีของการใช้สิ่งส่งตรวจเป็น Plasma ในงานเคมีคลินิก เมื่อเปรียบเทียบกับ Serum**
   1. สามารถปั่นแยก Plasma ได้ทันที (กรณี Serum ต้องรอให้เลือดแข็งตัว 30 นาทีก่อนปั่นแยก Serum)
   2. ในเลือดปริมาณที่ท่ากันเมื่อนำไปปั่นแยกมักจะได้ปริมาณ Plasma มากกว่า Serum
   3. อัตราการเกิด Hemolysis ของ Plasma น้อยกว่า Serum
   4. Plasma พบอัตราการเกิดการอุดตันใน Sample Probe หรือ สายทางเดินน้ำยา จากก้อน Fibrin น้อยมากเมื่อเทียบกับ Serum

   ที่มาข้อมูล : .W.G. Guder, S. Narayanan, Sample : From the Patient to the Laboratory, 1996