นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลการเปรียบเทียบคุณลักษณะของเซลล์ลิมโฟซัยท์ในน้ำไขสันหลังปลอมที่เตรียมด้วยวิธีต่างๆ

ศิวดี เหลืองสุวรรณ[1] และ นิภา วลัยพัชรา[2]

[1]ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

[2]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

วัตถุประสงค์: *เพื่อศึกษาปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธีและศึกษาการย้อมน้ำไขสันหลังปลอมที่ได้ว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือไม่* ***วัสดุและวิธีการ:*** *นำเลือดจาก EDTA blood ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์สูง เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ที่ได้จากเลือดที่ทำจาก HLA typing ที่เหลือใช้แล้วจากธนาคารเลือด และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ โดยวิธีประยุกต์ lymphoproliferation assay ปั่นล้าง ที่ความเร็วรอบต่างๆ กัน ได้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ และนำมาตรวจนับด้วย counting chamber โดยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ 3 คน แล้วนำค่ามาเฉลี่ย จากนั้นนำมาผสมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ตามโจทย์ปัญหาที่กำหนดไว้ แล้วนำมา smear ย้อม เพื่อดูการติดสีของเซลล์ที่ได้ ต่อไป* ***ผลการทดลอง:*** *จากการศึกษาเปรียบเทียบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ที่ได้จากวิธีที่ 1, วิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 พบว่า จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ที่ได้จากทั้ง 3 วิธี ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p-value $\leq$ 0.05 แต่วิธีที่ 1 และ 2 มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และวิธีที่ 3 สามารถเตรียมแซลล์ได้มีลักษณะชัดเจนและใช้เวลาน้อยสามารถเตรียมก่อนวันสอนได้ในวันนั้น* ***สรุป:*** *ผลการทดลองวิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมด้วยวิธีประยุกต์ lymphoproliferation assay สามารถเตรียมได้จำนวนเซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์สูง ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย สามารถเตรียมได้รวดเร็วและย้อมด้วยสี wright ได้เซลล์มีลักษณะชัดเจน สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุในการเรียนการสอนได้*

Key Words: ● *น้ำไขสันหลังปลอม* ● *วัสดุการเรียนการสอน* ● *lymphoproliferation assay*

เวชสารแพทย์ทหารบก 2552;62:11-6.

การเตรียมน้ำไขสันหลังปลอม (artificial CSF) เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนภาคปฏิบัติทางวิชาพยาธิวิทยาคลินิกที่เกี่ยวข้องกับการตรวจน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid : CSF) สาเหตุที่ต้องเตรียมน้ำไขสันหลังปลอม เนื่องจากไม่มีปริมาณน้ำไขสันหลังจำนวนมากเพียงพอที่จะใช้ ในการเรียนการสอนเพื่อฝึกฝนทักษะ เดิมนั้นวิธีการเตรียมใช้เตรียมจากหลายวิธี เช่น เตรียมจาก EDTA blood ที่มีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ปริมาณมาก หรือเตรียมจากเลือด ที่ทำจาก HLA typing ที่เหลือใช้แล้ว จากธนาคารเลือด[1] แต่มักจะพบปัญหาว่า น้ำไขสันหลังปลอมที่ได้มักจะมีแบคทีเรียปนเปื้อนเสมอ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมเรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ซึ่งพบว่าการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมด้วยวิธีการใหม่ใช้เทคนิคทาง immunology มาประยุกต์วิธี lymphoproliferation assay[3] ในการเตรียม mononuclear cell มาประกอบจะได้น้ำไขสันหลังปลอมที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ปริมาณมาก และไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมทั้ง 3 วิธี ได้ผลเหมือนกันหรือแตกต่างกันอย่างไร รายงานนี้จึงศึกษาวิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมทั้ง 3 วิธี โดยศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ที่ได้จากแต่ละวิธี การ

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 29 มกราคม 2552 ได้ให้ตีพิมพ์เมื่อ 30 มกราคม 2552

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ ศิวดี เหลืองสุวรรณ ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล 2 ถนนพรานนก บางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

ย้อมดูเซลล์ที่เตรียมได้และการปนเปื้อนของแบคทีเรีย รวมถึงระยะเวลาการเตรียมเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอม เพื่อใช้เป็นสารน้ำในการเรียนการสอนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ที่ได้จากแต่ละวิธี เพื่อเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ในการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอม

2. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมที่มีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte สูง ทั้ง 3 วิธีว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างไร

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. Donor blood 20 mL ใส่ใน heparin tube (10 IU/mL) ที่อุณหภูมิห้อง
2. EDTA blood 20 -30 mL ที่มี เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ lymphocyte สูง
3. น้ำยา RPMI 50-100 mL
4. น้ำยา Histoplaque® (density 1.077) 50 mL
5. เครื่อง CRM-5000 centrifuge ความเร็ว 1,800 - 5,000 RPM ที่ปรับตั้งอุณหภูมิได้
6. น้ำเกลือ (Normal saline)
7. 0.87% NH_4Cl 20-100 mL.
8. 0.2% tryphan blue
9. Falcon centrifuge ขนาด 50 mL.
10. Serofuge
11. CO_2 incubator
12. Vortex mixer
13. Laminar flow hood
14. Pipettes 10 mL
15. Pasture pipettes
16. หลอดทดลอง ขนาด 16 x 125
17. สี wright stain, gram stain

วิธีเตรียม 0.87% NH_4Cl

NH_4Cl	4.653 gm
น้ำกลั่น	1,000 mL

วิธีเตรียม fixed solution : เพื่อให้เซลล์คงสภาพเดิมได้ดีที่สุด

Anh. Na_2SO_4	7 gm
Anh. NaCl	9 gm
Glacial acetic acid	40 mL
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000 mL

วิธีการทดลอง

1. วิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมที่มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte สูง เพื่อใช้ในการทำ cell count และ cell differential ดังนี้

วิธีที่ 1 เป็นการเตรียมจาก EDTA blood ที่มีปริมาณเซลล์ lymphocyte ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เตรียม EDTA blood ที่มีปริมาณ lymphocyte ที่อุณหภูมิ 0-4° C นาน 2-3 ชั่วโมง
2. ดูด platelet-rich plasma ทิ้ง ระวังอย่าให้ใกล้ส่วน buffy coat
3. นำ buffy coat ที่เหลือมาปั่นที่ 2,200 rpm. นาน 2-3 นาที
4. ดูดเอาส่วน supernatant ทิ้งไปหลายๆ ครั้ง จึงจะได้เซลล์ lymphocyte โดยที่ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงปนมาเลย หรือปนมาน้อยที่สุด
5. ล้างด้วยน้ำเกลือ ประมาณ 2-3 ครั้งๆ สุดท้ายดูดเอา supernatant ทิ้งให้หมดแล้วเจือจางด้วย fixed solution แต่ถ้ายังมี เม็ดเลือดแดงปนอยู่ให้สลายออกด้วย 0.87% NH_4Cl

วิธีที่ 2 เป็นการเตรียมจากเลือดที่มีปริมาณเซลล์ lymphocyte ที่ได้จาก HLA typing ของวันนั้น ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้[1]

1. เตรียม fixed solution
2. นำ fixed solution ประมาณ 10 mL. ไปให้ธนาคารเลือด เพื่อเท lymphocyte ที่ทำ HLA typing ของวันนั้น ลงในขวดที่มี fixed solution ประมาณ 20 mL. ผสมให้เข้ากัน แล้วรีบนำมาปั่นล้าง
3. ปั่นล้างด้วย fixed solution 3 ครั้ง ให้เสร็จภายในวันนั้น แล้วนำมาตรวจดูว่า มีจำนวนเซลล์ lymphocyte มากหรือน้อย เพียงไร ถ้าไม่เพียงพอ ให้ทำซ้ำในข้อที่ 1-3 นี้อีก 3 วัน จึงจะได้จำนวนเซลล์ lymphocyte เพียงพอในการเรียนการสอนแต่ละครั้ง

วิธีที่ 3 เป็นการเตรียมจากการประยุกต์เทคนิค lymphoproliferation assay ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้[1,2,3]

1. นำเลือดที่ใส่ heparin (10 IU/1m:L) จำนวน 20 mL ผสมกับน้ำยา RPMI 20 mL (อัตราส่วนเลือดต่อน้ำยา 1:1) แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูดน้ำยา Histoplaque® (density 1.077) จำนวน 3 mL ซึ่งอุ่นแล้ว ใส่ลงใน tube ก้นแหลม ต่อไปเทเลือดเบาๆ ลงใน tube ดังกล่าว จำนวน 7 mL ก็จะได้ solution แยกเป็น 2 ชั้น (ไม่ทิ้งเลือดไว้นาน เพราะจะตกตะกอนในน้ำยา Histoplaque® (density 1.077) ต่อจากนั้นนำ solution ที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง CRM-5000 centrifuge ที่ 1,800 rpm. ณ อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2. หลังจากปั่นเสร็จแล้ว จะเห็น solution แยกเป็นวงแหวนซึ่งเป็นส่วนของ lymphocyte และ mononuclear cell ให้ดูดส่วนนี้ใส่ลงใน tube ก้นแหลมที่มีน้ำยา RPMI 5 mL แล้วใช้ pipette ผสมให้เข้ากันเพื่อป้องกันเซลล์แตก แล้วจึงนำไปปั่นด้วยเครื่อง CRM-5000 centrifuge ที่ 1,800 rpm. ณ อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที โดยทำการปั่นล้าง 3 ครั้ง เพื่อให้น้ำยา Histoplaque® (density 1.077) หมดไป และเซลล์ไม่สูญหาย

3. เทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอน คือเซลล์ที่ได้ ดูดตะกอนใส่ tube ก้นแหลมที่มี 0.87% NH_4Cl จำนวน 3 mL ผสมให้เข้ากันเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง CRM-5000 centrifuge ที่ 1,800 rpm. ณ อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำยา RPMI 5 mL จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1,800 rpm. ณ อุณหภูมิ 8°C อีก 1 ครั้ง

4. ดูดส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนจะได้เซลล์ประมาณ 1 μL ผสมกับ 1% paraformaldehyde (เพื่อช่วยเซลล์คงสภาพเดิม:fixed cell) จำนวน 2 mL และน้ำยา fixation 1 mL เขย่าให้เข้ากัน

โดยทั้ง 3 วิธี ถ้าต้องการนับเซลล์นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocyte ใช้นับด้วย counting chamber โดยใช้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ 3 คน นับ แล้วหาเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ได้

2. ทดสอบหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดยการผสมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ที่แยกโดยวิธีดังต่อไปนี้

วิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมที่มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil สูง

1. นำ EDTA blood ที่มีผลรายงานว่ามีจำนวน neutrophil > 90% หลาย tube มาผสมรวมกันให้ได้ประมาณ 20 mL

2. เติม 0.87% NH_4Cl ปร ะมาณ 3 เท่าของเลือด ผสมตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3. ปั่นแยกด้วยเครื่อง serofuge ที่ความเร็ว 1,500 rpm. เป็นเวลา 15 วินาที

4. เทส่วนใสทิ้ง ถ้ายังมี RBC อยู่ให้ทำซ้ำ ข้อ 2 และ 3 ไปจนกว่าจะไม่มีเม็ดเลือดแดง เหลืออยู่

5. นำ solution ที่ได้มาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ (Normal saline) 1 ครั้ง โดยปั่นด้วย ความเร็ว 1,500 rpm. เป็นเวลา 15 วินาที

6. เติม fixation solution ตามที่เราต้องการว่าจะให้มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมากหรือน้อยเพียงไร

นำ solution ที่ได้จากข้อ 1: ซึ่งเตรียมโดยวิธีที่ 1, 2, 3 (lymphocyte) มาผสมกับ solution ที่ได้จากข้อ 2 (neutrophil) ตามโจทย์ปัญหาที่อาจารย์ผู้สอนกำหนด เช่น ต้องการน้ำไขสันหลังปลอมที่มีจำนวนเซลล์ lymphocyte 90% และ neutrophil 10% จากนั้นนำน้ำไขสันหลังปลอมที่เตรียมได้ มาย้อม wright stain เพื่อดูรูปร่างของเซลล์ว่า ไม่แตก และมีรูปร่างดี (G = ดี NG = ไม่ดี) มีจำนวน cell ตามที่ต้องการ และมีแบคทีเรียปนเปื้อนหรือไม่

3. ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเซลล์ก่อนวันสอนจริงโดยใช้การเตรียมทั้ง 3 วิธีเพื่อให้สามารถเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมที่มีเซลล์ lymphocyte ผสมกับเซลล์ neutrophil ได้ทันในวันสอนจริงกับนักศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลนำเสนอ เป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation, SD) หรือจำนวนร้อยละตามความเหมาะสม และใช้ ANOVA test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างวิธีการเตรียมน้ำไขสันหลังปลอมทั้ง 3 วิธี โดยค่า p-value < 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่ ธันวาคม 2547 ถึง มกราคม 2551 โดยได้จัดเตรียมน้ำไขสันหลังปลอม (artificial CSF) ในการเรียนการสอน ภาคปฏิบัติ รวมทั้งสิ้นจำนวน 10 ครั้ง โดยจัดเตรียมให้มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte 90% และ neutrophil 10% ดังนี้

1. ผลการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ทั้ง 3 วิธี

จากการทดลองครั้งนี้ ได้ศึกษา accuracy และ precision

ในการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocyte ทั้ง 3 วิธี โดยใช้ counting chamber และใช้นับจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ 3 คนซึ่งทั้ง 3 คนนี้ไม่รู้ผลซึ่งกันและกัน และได้ทดสอบความสอดคล้องการแปรผลแล้วไม่แตกต่างกันทั้ง 3 คน แล้วหาเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ได้ พบว่า ผลการนับเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocyte ทั้ง 3 วิธี ได้ผลไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p-value $\leq$ 0.05 ดังรูปที่ 1

2. ผลการย้อมดู การปนเปื้อนของแบคทีเรีย จากน้ำไขสันหลังปลอมทั้ง 3 วิธี

ผลการย้อมดู การปนเปื้อนของแบคทีเรีย จากน้ำไขสันหลังปลอมทั้ง 3 วิธี พบว่า วิธีที่ 1 และ 2 ยังพบการปนเปื้อน ของเชื้อแบคทีเรีย อยู่บ้าง ปริมาณที่พบ ตั้งแต่ rare - few ส่วนวิธีที่ 3 ไม่พบการปนเปื้อน ของเชื้อแบคทีเรีย ดังตารางที่ 1

3. ระยะเวลาที่เตรียมเซลล์ก่อนวันสอนจริง

ระยะเวลาที่เตรียมเซลล์ก่อนวันสอนจริง พบว่า วิธีที่ 1 ใช้เวลาเตรียมประมาณ 3 วันก่อนวันสอนจริง วิธีที่ 2 ใช้เวลาเตรียมประมาณ 4 วันก่อนวันสอนจริง และวิธีที่ 3 ใช้เวลาเตรียมประมาณ 1 วันก่อนวันสอนจริง ซึ่งถือว่ารวดเร็วและประหยัดเวลา ดังตารางที่ 2

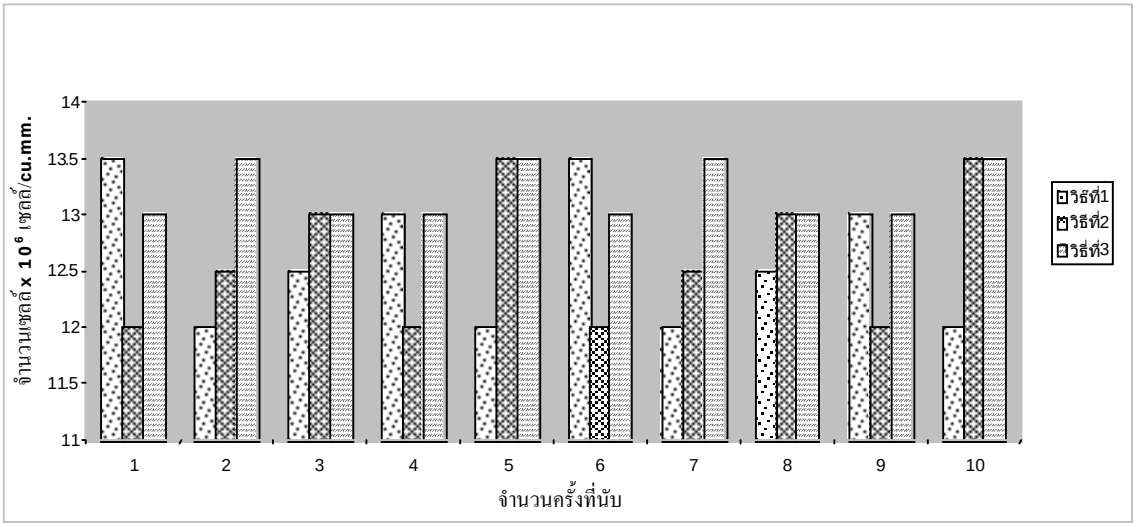
4. ผลการย้อมลักษณะของเซลล์ที่เตรียมได้

ผลการย้อมลักษณะของเซลล์ที่เตรียมได้ พบว่าวิธีที่ 1, 2 ลักษณะของเซลล์ที่เตรียมได้ มีเซลล์แตก มีลักษณะไม่สวย อาจจะเนื่องจากระยะเวลาในการเตรียมเซลล์ใช้เวลามากกว่าวิธีที่ 3 ดังตารางที่ 3

วิจารณ์และสรุป

ในปัจจุบันจะเห็นว่า การเรียนการสอนทางภาคปฏิบัติได้ปรับเปลี่ยนรูปแบบ โดยมีการใช้เทคโนโลยีเข้ามาช่วยสอนมากมาย แต่ในการเรียนรู้และฝึกทักษะการตรวจน้ำไขสันหลังนั้นยังไม่มีเทคโนโลยีใดมาแทนได้ จากการศึกษานี้พบว่าการเตรียมน้ำไขสัน

รูปที่ 1 กราฟแสดงผลการนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocyte ทั้ง 3 วิธี



ตารางที่ 1 แสดงผลการย้อม Gram stain ดูการปนเปื้อนของแบคทีเรีย จากน้ำไขสันหลังปลอม ทั้ง 3 วิธี

วิธีที่ / ครั้งที่	การปนเปื้อนแบคทีเรีย									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1	rare	rare	rare	few	few	rare	rare	rare	few	few
2	few	few	few	few	few	few	few	few	few	few
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

rare : การปนเปื้อน ของเชื้อแบคทีเรีย พบนานๆครั้ง 0-1 cell/ HPF เมื่อดูด้วกำลังขยาย X100

few : การปนเปื้อน ของเชื้อแบคทีเรีย พบไม่มากเกิน 1-2 cell/ HPF เมื่อดูด้วกำลังขยาย X100

ตารางที่ 2 แสดงระยะเวลาที่เตรียมเซลล์ก่อนวันสอนจริง ทั้ง 3 วิธี

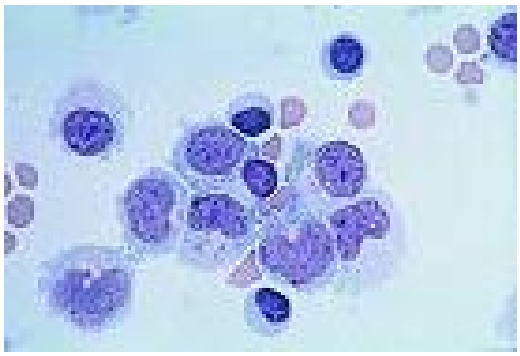
วิธีที่ / ครั้งที่	จำนวนวันที่เตรียม (วัน)									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางที่ 3 ผลการย้อมลักษณะของเซลล์ที่เตรียมได้ทั้ง 3 วิธี

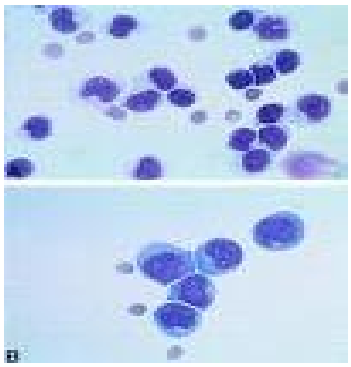
วิธีที่ / ครั้งที่	ลักษณะเซลล์ที่เตรียมได้									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1	G	NG	NG	G	G	G	NG	NG	G	G
2	NG	NG	NG	NG	G	NG	NG	G	NG	G
3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

G = ดี, NG = ไม่ดี

รูปที่ 2 Lymphocyte และ neutrophil ที่เตรียมได้ย้อม Wright stain



X 40 เท่า (oil)



X 100 เท่า (oil)

หลังปลอม (artificial CSF) ทั้ง 3 วิธี นั้นได้จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าวิธีที่ 3 จะได้จำนวนเซลล์มากกว่าและไม่พบมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งถือได้ว่าเป็นนวัตกรรมด้านการเรียนการสอนในภาคปฏิบัติของนักศึกษา ที่ยังเป็นสิ่งจำเป็นต้องจัดเตรียมคู่กับการเรียนการสอนดังกล่าวต่อไป

ขอบคุณ

เจ้าหน้าที่ธนาคารเลือด เจ้าหน้าที่ภาควิชาภูมิคุ้มกัน เจ้าหน้าที่สาขาโลหิตวิทยาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Boyum A. Separation of leukocyte from blood and bone marrow. Scan J Clin Lab Invest 1968;21(Suppl 97):1-109.
2. Harbeck RJ, Giclas PC. Diagnostic immunology laboratory manual: lymphocyte stimulation with mitogens and antigens. New York: Raven Press; 1991.p.211-9.
3. Fletcher MA, Klimas N, Morgan R, Gjerset G. Lymphocyte proliferation. In: Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, eds. Manual of clinical laboratory immunology. 4th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 1992.p.213-9.

Comparison of Lymphocyte Characteristics in Artificial Cerebrospinal Fluid Prepared Different Methods

Laungsuwan S.[1] and Walaiphacharaa N.[2]

[1]Department of Clinical Pathology, Faulty of Medicine, Mahidol University

[2]Department of Pathology ,Faculty of Science ,Ruengsit university

Objective: *To study the three method of preparation of artificial cerebrospinal fluid and observe the bacterial contamination after performing each technique.* ***Materials and methods:*** *Preparation lymphocyte cell from EDTA blood with high lymphocyte, high lymphocyte discarded after HLA typing and apply lymphoproliferation assay, three methods were rinsed by solution and centrifuged with any rpm. to get lymphocyte cell. The lymphocytes cell from three methods were counted by three technicians and mixed to neutrophils cell according to case study. The lymphocytes and neutrophils were smeared for differentiation.* ***Result:*** *The comparison of three methods to preparation lymphocytes cell showed that three techniques yielded are no significant difference for the lymphocyte cell count (p-value $\leq$ 0.05) but the lymphoproliferation assay provided no bacterial contamination and easy to preparation in one day.* ***Conclusion:*** *Artificial cerebrospinal fluid prepared by provided higher lymphocyte count with no bacterial contamination better than the two methods and distinct morphology in Wright stain. So this technique could be used as learning and teaching material.*

Key Words: ● *Artificial Cerebrospinal Fluid* ● *Learning and teaching material* ● *Lymphoproliferation assay*

RTA Med J 2009;62:11-6.