บรรณานุกรม

1. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค กระทรวงสาธารณสุข, มกราคม, 208,2528.
2. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค กระทรวงสาธารณสุข, มกราคม, 20(2), 19-21, 2532.
3. ลัดดาวัลย์ ชื่นจิตร, ประมวล สุนากร, วาณี ราชเวชชพิศาล, "การตายของโรคปอดอักเสบในเด็ก," วารสารสมาคมกุมารแพทย์. 22, 123-128, 2526.
4. สุภัทรา ลิ้มอุดมพร, นวลจันทร์ ปราบพาล, แวกาญจน์ สุทธิบรูณ์, วรรณา พรรณรักษา, "ปอดอักเสบจากเชื้อ เร็สไปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัสในผู้ป่วยเด็ก: อุบัติการของโรค และอาการทางคลีนิค," จุฬาลงกรณ์เวชสาร., มิถุนายน, 36, 531-536, 2531.
5. Bartlett, J. G., P. O. Keefe, F. P. Tally, T. J. Louie, S. L. Goibach, "Bacteriology of Hospital-acquired Pneumonia," Arch. Intern. Med., 146, 868-871, 1986.
6. Christine, M. W., F. A. Khan, A. Khan., Clinical in Chest Medicine, pp 393-394, W. S. Saunders Co., Philadelphia, 1987.
7. Burr, M. L., "A Survey of Nasal *Streptococcus pneumoniae* in Children," J. Hyg. Camb., 88, 425-431, 1982.
8. Malcom, G. H., "Pneumococcal typing by Polyvalent Counter-immunoelectrophoresis," J. Immunol. Method., 46, 243-249, 1981.
9. Holmberg, H., A. Krook, A. M. Sjogern, "Determination of Antibodies to Pneumococcal C Polysaccharide in Patients with Community-acquired Pneumonia,"

J. Clin. Micro. 22, 808-814, 1985.

10. Wilson, F. M., A. M. Lerner, "Etiology and Mortality of Purulent Meningitis at the Detroit Receiving Hospital," New. Engl. J. Med., 271(24), 1235-1238, 1964.

11. Jamel, F., S. Pit, I. Isahak, N. Abdullah, Z. Zainal, R. Abdullah, J. Henrichsen, "Pneumococcal Infection in Hospitalized Patients: A four-year study in Malaysia," Southeast. Asian. J. Trop. Med. Pub. Hlth. 18, 79-83, 1987.

12. โสภณ คงสำราญ, แบคทีเรียทางการแพทย์, โครงการตำรา-ศิริราช, 225-223, 2452-248, 2524.

13. ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์, วิภา อนันต์ชนะชัย, อัมพร สุคนธมาน, "การติดเชื้อของ *Streptococcus pneumoniae*," จุฬาลงกรณ์เวชสาร., 28, S39, 2526.

14. Broome, C. V., "Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b Infections in the United States," Pediatr., Infect. Dis. J., 6, 779-782, 1987.

15. Norden, C. W., "*Haemophilus influenzae* Infections in Adults," Med. Clin. Noe. Am., 62, 1037-1046, 1978.

16. Katz, S. L., E. A. Mortimer, "*Haemophilus influenzae* type b: the Disease and its Prevention," Pediatr. Infect. Dis. J., 6, 773-774, 1987.

17. Harley, A. R., M. P. Glode, "*Haemophilus influenzae* type b Septic Arthritis in Children: Report of 23 Cases," Pediatrics., 75(2), 254-259, 1985.

18. Granoff, D. M., M. P. Glode, "Cellulitis due To *Haemophilus influenzae* type b," Am. J. Dis. Child., 130,

1211-1214, 1976.

19. Ward, J. I., M. K. W. Lum, D. B. Hall, D. R. Silimperi, T. R. Bender, "Invasive *Haemophilus influenzae* type b Disease in Alaska. Background Epidemiology for a Vaccine Efficacy Trail," J. Infect. Dis., 153(1), 17-26, 1986.

20. Smith, A. L., "Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* Meningitis," Pediatr. Infect. Dis. J., 6(8), 783-786, 1987.

21. Sarah, H. S., "*Haemophilus influenzae* type b Meningitis: Manifestations and Long Term Sequale," Pediatr. Infect. Dis. J., 6(8), 775-778, 1987.

22. Jacob, N. J., S. Lerdachornsuk, W. I. Metzger, "Pneumococcal Bacteremia in Infants and Children: A ten-year Experience at the Cook Country Hospital with Special Reference to the Pneumococcal Serotypes Isolates," Pediatrics., 64, 296-300, 1979.

23. สมศักดิ์ ไล่ห์เลขา, ดุษฎี เจริญพิภพ, "การวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเด็กด้วย Counter-immunoelectrophoresis," รามาธิบดีเวชสาร., 1, 133-137, 2527.

24. Gray, B. M., H. C. Dillon, "Clinical and Epidemiologic Studies of Pneumococcal Infection in Children," Pediatr. Infect. Dis. J., 5(2), 201-207, 1986.

25. Shulman, J. S., L. A. Phillips, R. G. Petersdorf, "Errors and Hazards in the Diagnosis and Treatment of Bacterial Pneumonia," Ann. Inter. Med., 62(1), 41-58, 1965.

26. Vanmetre, T. E., "Pneumococcal Pneumonia Treated with

Antibodies," New. Engl. J. Med., 251, 1048-1052, 1954.

27. Shann, F., M. Gratten, S. Germer, V. Linnermann, D. Hazlett, R. Payne, "Aetiology of Pneumonia in Children in Goroka Hospital, Papua New Guinea," Lancet, 2, 537-541, 1984.

28. Centers for Disease Control, "Pneumococcal Polysaccharide Vaccine: Recommendation of the Immunization Practices Committee," Ann. Inter. Med., 90, 203-205, 1982.

29. Centers for Disease Control Update, "Pneumococcal Polysaccharide Vaccine usage-United States: Recommendation of the Immunization Practices Advisory Committee," Ann. Inter. Med., 101, 348-350, 1984.

30. Codoz, M., J. Armand, F. Arminjon, J. P. Michel, M. Michel, F. Denis, G. Schiffman, "A New 23 Valent Pneumococcal Vaccine: Immunogenicity and Pathogenicity in Adults," J. Biol. Scand., 13, 261-265, 1985.

31. Peltola, H., H. Kayhty, A. Sivonen, P. H. Makela, "*Haemophilus influenzae* type b Capsular Polysaccharide Vaccine in Children: A Double-blind Study of 100,000 Vaccines 3 months to 5 years of Age in Finsland." Pediatrics., 60, 730-777, 1977.

32. Cael, A. P., "Laboratory Diagnosis of Pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae*," J. Infect. Dis., 150(1), 139-144, 1984.

33. Fileds, P., "The Growth Requirements of *Haemophilus influenzae*, and the Bearing of these Upon the Classification of

Related Organism," Brit. J. Exp. Path., 5, 69-74, 1924.

34. ไหม รัตนวารักษ์, ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์, ดิลก เย็นบุตร, "วิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อบัคเตรี 3 ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ," จุฬาลงกรณ์เวชสาร., 22, 81-92, 2522.

35. Severin, W. P., "Latex Agglutination in the Diagnosis of *Meningococcal meningitis*," J. Clin. Pathol., 25, 1079-1082, 1972.

36. Newman, R. B., R. W. Stevens, A. Hagaufar, "Latex Agglutination Test for the Diagnosis of *Haemophilus influenzae* Meningitis," J. Lab. Clin. Med., 76, 107-113, 1970.

37. Kaldor, J., R. Asznowicz, G. P. Buist, "Latex Agglutination in Diagnosis of Bacterial Infections with Special Reference to Patients with Meningitis and Septicemia," A. J. C. P., 68, 284-249, 1977.

38. Ajello, G. W., G. A. Bolan, P. S. Hayes, D. Lehmann, J. Montgomery, J. C. Feeley, C. A. Peilino, C. V. Broome, "Commercial Latex Agglutination Tests for Detection of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* Antigens in Patients with Bacteremic Pneumonia," J. Clin. Micro., 25, 1388-1389 1987.

39. David, W. S., J. J. Ward, G. R. Slber, "Advantage of Latex Agglutination over Countercurrent Immunoelectrophoresis in the Detection of *Haemophilus influenzae* type b Antigen in Serum," Pediatrics., 68(6), 888-890, 1981.

40. ฉัตรชัย ศรชัย, วิทยานิพนธ์เพื่อปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2521.

41. William, B., Text Book of Microbiology, pp 565-568, WB. Saunders Company, London, 20th ed., 1973.

42. Jawetz, E., J. C. Melmick, E. A. Asellerg, Review of Medical Microbiology, pp 241-262, Academic Press, London, 12th ed, 1978.

43. Coonrod, J. D., D. P. Drennan, "Pneumococcal Pneumonia: Capsular Polysaccharide Antigenemia and Antibody Response," Ann. Inter. Med., 84, 254-260, 1976.

44. Lars, A. B., B. Trollfors, R. Norrby, E. Falsen, S. Haidl, J. Henrichsen, "Serotype Distribution of *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated from Blood and Cerebrospinal Fluid in Sweden," Scand. J. Infect. Dis., 18, 45-48, 1986.

45. Lund, E., J. Henrichsen, Methods in microbiology, pp 241-262, Academic Press, London, 12th ed., 1978.

46. Alexander, H. E., G. Leidy, C. MacPhusan, "Production of type a,b,c,d,e and f *Haemophilus influenzae* Antibody for Diagnostic Purpose," J. Immunol., 54, 207-211, 1946.

47. Smith, D., N. Conant, H. Willet, Zinsser Microbiology, pp 490-499, Appleton-Century-Crofts, Inc., New York, 14th ed., 1968.

48. Robbins, J. B., R. Schneerson, "*Haemophilus influenzae* type b: the Search for a Vaccine," Pedirt. Infect. Dis., 6, 791-794, 1987.

49. Dunlep, M. B., H. S. Harvey, "Host Influence on Upper Respiratory Flora," New. Engl. J. Med., 255, 640-646, 1956.

50. Parke, J. C., "Capsular Polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b as a Vaccine," Pedirtr. Infect. Dis. J., 6, 795-798, 1987.

51. Robbins, J. B., "Vaccines for the Prevention of Encapsulated Bacterial Disease: Current Status, Problems and Prospects for the Future," Immunochemistry., 15, 839-854, 1978.

52. Peter, G., "Treatment and Prevention of *Haemophilus influenzae* type b Meningitis," Pediatr. Infect. Dis. J., 6, 787-790, 1987.

53. Wallae, R. J., D. M. Musher, R. R. Martin, "*Haemophilus influenzae* Pneumonia in Adults," Am. J. Med., 64, 87-93, 1978.

54. Barnes, J. D., S. Naragi, J. D. Igo, "*Haemophilus influenzae* Pneumonia in Melanesian Adults: Report of 15 Cases," Thorax., 42, 889-891, 1987.

55. Jonh, L. C., R. H. Michaels, C. Hallowell, R. Schults, T. K. Welty, J. S. C. Kuo, "Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b Disease among Navajo Indians," Public. Health. Reports., 99(4), 405-409, 1984.

56. Hansman, D., "Serotypes in Pneumococcal disease a ten year Study in Australia 1970 through 1979," Aust. NZ. J. Med., 13, 359-364, 1983.

57. Trudy, V. M., M. T. Osterholm, L. M. Pierson, K. E. White, J. A. Breedlove, G. B. Seibert, J. N. Kuritsky, D. M. Granoff," Prospective Survellance of *Haemophilus influenzae* type b Disease in Dallas Country, Texas, and in Minnesota," Pediatrics., 79(2), 173-180, 1987.

58. Richard, A. I., P. W. Anderson, "Cross-reactivity with *Escherichia coli* K 100 in the Human Serum Anticapsular Antibody Response to *Haemophilus influenzae* type b," J. Immunol., 128(3), 1267-1270, 1982.

59. Ward, J.,"Newer *Haemophilus influenzae* type b Vaccines and Passive Prophylaxis," Pediatr. Infect. Dis., 6, 799-803, 1987.

60. Lepow, M., "Clinical Trial of the *Haemophilus influenzae* type b Capsular Polysaccharide-Diptheria Toxoid Conjugate Vaccine," Pediatr. Infect. Dis. J., 6, 804-807, 1987.

61. Murphy,T. V., "*Haemophilus influenzae* b Polysaccharide Vaccine Need for Continuing Assessment," Pediatr. Infect. Dis., 6, 701-703, 1987.

62. Simong, G., "Efficacy of Pneumococcal Vaccine," Ann. Inter. Med., 105(1), 147-147, 1986.

63. Rein, M. R., J. M. Gwaltney, W. M. O'Brien, "Accuracy of Gram's Stain in Identifying Pneumococci in Sputum," JAMA., 239, 2671-2673, 1978.

64. Kalin, M., A. A. Lindberg, G. Tunevall, "Etiological Diagnosis of Bacterial Pneumonia by Gram's Stain and Quantitative Culture of Expectorates," Scand. J.

Infect. Dis., 15, 153-160, 1983.

65. Collins, J. K., M. T. Kelly, "Comparison of Phadebact Co-agglutination, Bactigen Latex Agglutination and Counter-immunoelectrophoresis for Detection of *Haemophilus influenzae* type b Antigens in Cerebrospinal Fluid," J. Clin. Micro., 17(6), 1005-1008, 1983.

66. Riera, L., "Detection of *Haemophilus influenzae* type b Antigenuria by Bactigen and Phadebact Test," J. Clin. Micro., 21(4), 638-640, 1985.

67. Whitby, M., K. G. Kristinsson, M. Brown, "Assessment of Rapid Methods of Pneumococcal Antigen Detection in Routine Sputum Bacteriology," J. Clin. Pathol., 38, 341-344, 1985.

68. Ward, J. L., G. R. Siber, D. W. Sheifele, D. H. Smith, "Rapid Diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b Infection by Latex Particle Agglutination and Counter-immunoelectrophoresis," J. Pediatr., 93(1), 37-42, 1978.

69. Heikkila, R. A., Takala, H. Kayhty, M. Leinonen, "Latex Agglutination Test for Screening of *Haemophilus influenzae* type b Carriers," J. Clin. Micro., 25(6), 1131-1133, 1987.

70. Meller, J., M. A. Sande, J. M. Gwaltney, "Diagnostic of Pneumococcal Pneumonia by Antigen Detection in Sputum," J. Clin. Micro., 7, 459-462, 1978.

71. Kilian, M., Manual of Clinical Microbiology, pp 387-393, American Society for Microbiology, Washington, DC.,

4th ed., 1985.

72. Mashall, K., Cowan & Stell's Manual for the Identification of Medical Bacteria, pp 168, Cambridge University Press, Cambridge: 2nd ed., 1974.

73. Coonrod, J. D., M. W. Rytel, "Detection of type-specific Pneumococcal Antigens by Counterimmunoelectrophoresis: Methodology and Immunologic Properties of Pneumococcal Antigens," J. Lab. Clin. Med., 81(5), 770-777, 1973.

74. ไหม รัตนารารักษ์ , สดใส เวชชาชีวะ, วิธีทำและการแปลผลการทดสอบทาง serology, โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, 28-32, กันยายน, 2527.

75. Carol, A. H., S. J. Barenkamp, G. A. Storch, "Comparison of Methods for Serotyping Isolates of *Haemophilus influenzae*," J. Clin. Micro., 21(2), 158-160, 1985.

76. Lund, E., "Laboratory Diagnosis of Pneumococcal Infection," Bull. Org. Mond. Sante., 23, 5-13, 1960.

77. Finegold, S. M., Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, pp 384, CV. Mosby Company, St. Louis, 7th ed., 1986.

78. Centers for Disease Control, Standard Operating Procudures, BPP/003. 1978.

79. Brown, S. L., G. C. Klein, F. T. Mckinney, W. L. Jones, "Safranin-O Stained Antigen Microagglutination Test for Detection of Brucella Antibodies," J. Clin. Micro., 13, 398-400. 1981.

80. Teresa, L., P. Branefors, "Nature of Cross-reactivity between *Haemophilus influenzae* type a and b and *Streptococcus pneumoniae* type 6 A and 6B," Acta. Path. Microbiol.

Immunol. Scand. Sect. C., 91, 371-376, 1983.

81. Kronvall, G., "A Rapid Slide-agglutination Method for typing Pneumococcal by Means of Specific Antibody Adsorbed to Protein-A Containing Staphylococci," J. Med. Microbiol., 6, 187-190, 1973.

82. Smart, L., "Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* Strains by Co-agglutination," J. Clin. Pathol., 39, 328-331, 1986.

83. Goding, J. W., "Conjugation of Antibodies with Fluorochromes Modification to the Standard Methods," J. Immunol. Method., 13, 215-226, 1976.

84. สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลศรี พิมลพันธุ์, สายสุนีย์ วนดุรงค์วรรณ, นภาธร บานชื่น, อิมมูโนวิทยา, โรงพิมพ์อักษรสมัย, กรุงเทพฯ, 112-113, 2524.

85. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, " Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

86. Richard, I., P. Anderson, Manual of Clinical Laboratory Immunology, pp 379-384, American Society for Microbiology, Washington, DC., 3th ed., 1986.

87. เติมศรี ชำนิจารกิจ, สถิติประยุกต์ทางการแพทย์, โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, พิมพ์ครั้งที่ 2, 140, ตุลาคม, 2527.

88. Koneman, E. W., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, pp 236-247, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 2nd ed., 1983.

89. Sugio, Y.,S. Furui, "Distribution of Pneumococcal Capsular Serotypes in Japan," Kobe. J. Med. Sci., 32, 105-113, 1986.

90. Mike, G., H. Gratten, A. Poli, E. Carrad, M. Raymer, G. Koki, "Colonisation of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in the Upper Respiratory Tract of Neonates in Papua New Guinea: Primary Acquisition, Duration of Carriage, and Relationship to Carriage in Mothers," Biol. Neonate., 50, 114-120, 1986.

91. Phamacia Fine Chemicals, Affinity Chromatography Principle & Methods, pp 48-51, Ljungforetagan A. B., Sweden, 1st ed., June, 1979.

92. Gray, B. M., G. M. Converse, H. C. Dillon, "Epidermiologic Studies of *Streptococcus pneumoniae* in Infants Acquisition Carriage and Infection During the First 24 months of Life," J. Infect. Dis., 142, 923-933, 1986.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

น้ำยาและสารเคมีต่าง ๆ

bovine serum albumin (Sigma, Mo., USA.)

Coomasie Brilliant blue R (Sigma, Mo.,USA.)

disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (E.Merck,Darmstadt, W.Germany)

glacial acetic acid (CH_3COOH) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

glycine (NH_2OCH_2COOH) (BDH, England)

hydrochloric acid (HCl) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

methanol (CH_3OH) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

Noble agar (Difco, Detroit, Michigan, USA.)

latex particle (Difco, Detroit, Michigan, USA.)

potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

Protein A-sepharose CL-4B (Phamacia, Uppsula, Sweden)

sodium azide (NaN_3) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (BDH, England)

sodium chloride (NaCl) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

sodium hydroxide (NaOH) (BDH, England)

Tris (Hydroxymethylaminomethan) (Tris $C_4H_{11}NO_3$) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany)

goat anti-rabbit IgG (DAKO, Igs., Glastrup, Denmark)

goat anti-rabbit serum (DAKO, Igs., Glastrup, Denmark)

<u>เครื่องแก้วและพลาสติก</u>

beaker (Pyrex, Corning, N.Y., USA.)

cylinder (Witeg, W.Germany)

erlenmayer flask (Pyrex, Corning, N.Y., USA.)

glass tube (Pyrex, Corning, N.Y., USA.)

disposible syring (Nipro Medical industries, Tokyo, Japan)

microtiter plate (96 หลุม; U plate) (Nunc, Roskilde, Denmark)

automatic pipet (Gilson, Lyon, France)

<u>เครื่องมือ</u>

analytical balance (Precisa, Switzerland)

centrifuge (Sowall, Duport, USA.)

fraction collector, Model alpha 400 (Buchler Fractometer, USA.)

incubator (Forma Scientific, Ohio, USA.)

mixer-vortex-genic (Scientific industries, N.Y., USA.)

ultrafiltration, stirred cells (Amicon, Danver, M.A., USA.)

UV-visible spectrophotometer, model ACTA CIII (Beckman, C.A.,USA.)

pH meter, PHM 83 (Radiometer, Copenhagen, Denmark)

waterbath, Iulabo TWB 12 (Seelbach, W.Germany)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *S.pneumoniae*

1. การเตรียม sheep blood agar

agar in beef	1.8 %
peptone	1 %
NaCl	0.3 %
$Na_2HPO_4-12H_2O$	0.2 %
defibrinated horse blood	5 %

แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เก็บที่ 4°C

2. การเตรียม serum broth

lacto-peptone	1 %
NaCl	0.3 %
$Na_2HPO_4-12H_2O$	0.2 %
dextrose	0.1 %
Hb (dried bovine Hb)	0.05 %

ปรับให้ได้ pH เท่ากับ 7.3-7.4

ผสมแล้วฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave จากนั้นเติม 5% horse serum

3. การเตรียม Sorensen buffer solution

M/15 KH_2PO_4	20	มล.
M/15 $Na_2HPO_4-2H_2O$	80	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

0.9% NaCl	300 มล.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *H. influenzae*

1. เตรียม XV supplement สำหรับ Levinthal media

เติมเลือดกระต่ายที่แยกเอาเส้นใย fribrin ออกแล้ว 20 มล. ลงใน brain heart infusion broth 200 มล. ต้มให้เดือดจนกระทั่งเห็นตะกอนเกิดขึ้น นำไปปรับให้ได้ pH 7.8 ด้วย 0.1 M NaOH จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 5000 g ที่ 4 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง กรองผ่าน milliporefilter ขนาด 0.45 µm เก็บไว้ที่ -20 °ซ.

2. การเตรียม Levinthal agar

Difco proteose peptone	45	กรัม
Bacto agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ละลายให้เข้ากัน แล้วฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave ก่อนที่จะเทใส่ plate ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติม XV supplement ลงไปในอัตราส่วน 1:1

3. การเตรียม Levinthal broth

ผสม Todd Hewitt broth และ XV supplement ในอัตราส่วน 3:1

การเตรียม X-,V- factor

1. การเตรียม X-factor

ละลาย 40 มล.ของเม็ดเลือดแดงที่ปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นพลาสม่าออกแล้ว ใน 100 มล. acetone-HCl เขย่าแรง ๆ ตลอดเวลาจนครบ 30 นาที ปั่น 2000 g นาน 30 นาที ดูดเอาแต่ส่วนน้ำใสมาเติมน้ำกลั่น 120 มล.จะได้ตะกอนของ hemin ปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนใน 0.1 M Na_2HPO_4 25 มล. นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave เก็บไว้ที่ -20 °ซ.

2. การเตรียม V-factor

ละลาย yeast 50 กรัมใน 100 มล.ของ 0.2 M.KH_2PO_4 ให้เข้ากัน อบที่ 80°ซ. นาน 20 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา นำไปปั่น 2000 g 30 นาที ดูดเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำใสมากรองผ่าน milliporefilter ขนาด 0.45 um. เก็บไว้ที่ -20°ซ.

3. การเตรียมแผ่น X-,V- factor

ตัดกระดาษกรอง Whatmann No.3 เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ฆ่าเชื้อด้วยการอบที่ 250°ซ. 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นชุบกระดาษกรองลงในสารละลายของ X-factor และ V-factor ดังกล่าวให้ชุ่ม อบไว้ที่ 37 °ซ. 24-36 ชั่วโมง

<u>วิธีทดสอบ</u>

ป้ายเชื้อ *H.influenzae* ที่ต้องการทดสอบบน trypticase soy agar จากนั้นวางแผ่น X-factor และ V-factor ห่างกันประมาณ 1-1.5 ซม. อบไว้ที่ 37°ซ. 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะ colony ของเชื้อที่ขึ้นรอบแผ่น X-,V-factor

<u>การอ่านผล</u>

H.influenzae จะขึ้นอยู่ระหว่าง X-factor และ V-factor โดยค่อนมาทาง X-factor เล็กน้อย ในขณะที่ *H.parainfluenzae* จะขึ้นรอบ ๆ V-factor เท่านั้นดังรูปที่ 18 (หน้า 98)

<u>การเตรียมน้ำยาสำหรับการแยกสกัด IgG</u>

1. น้ำยา 0.05 M. Tris ใน 0.15 M NaCl pH 8.6

Tris	6.057	กรัม
NaCl	8.766	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับให้ได้ pH 8.6 ด้วย 1 N HCl

2. น้ำยา 0.05 M acetate ใน 0.15 M NaCl pH 4.3

กรด glacial acetic 5.75 มล.ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

sodium acetate-$3H_2O$ 13.6 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

น้ำกลั่น 1000 มล.

<u>การเตรียมน้ำยาสำหรับวิธี Immunodiffusion</u>

1. sodium barbital buffer (0.05 M), pH 8.2

barbital sodium	47.6	กรัม
1 N HCl	69	มล.
10% NaN_3	4.2	มล.
น้ำกลั่น	4200	มล.

ปรับให้ได้ pH 8.2

2. สีที่ใช้ย้อม

Coomassie Brilliant blue R	5	กรัม
destaining solution	1000	มล.

เขย่าค้างคืนจนกระทั่งละลายเข้ากันดี

3. destaining solution

น้ำกลั่น	1000	มล.
กรด glacial acetic	2000	มล.
methanol	1000	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. 1.5% agar gel

special Noble agar	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ต้มวุ้นในน้ำเดือด 100 °ซ. จนกระทั่งละลายดีแบ่งใส่หลอดละ 20 มล. เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

<u>การเตรียมน้ำยา buffer ต่าง ๆ</u>

1. glycine buffer saline (GBS)

glycine	7.3	กรัม
NaCl	10	กรัม
NaN_3	1	กรัม
น้ำกลั่น	900	มล.

ปรับให้ได้ pH 8.2 ด้วย 1 M NaOH แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล.

2. Veronal buffer (0.1 M, pH 8.2)

ก. เตรียม 0.1 M barbital sodium

barbital sodium	2.0618	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ข. เตรียม 0.1 M barbital

barbital	1.842	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. เตรียม 0.1 M Veronal buffer

0.1 M barbital sodium 50 มล.

0.1 M barbital 6 มล.

ปรับ pH ให้ได้ 8.2 ด้วย 1 N HCl เก็บไว้ที่ 4 °ซ.

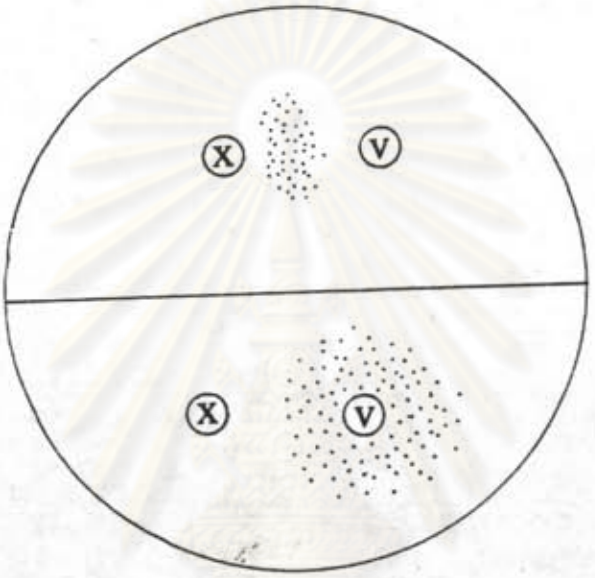
3. phosphate buffer saline pH 7.2 ± 0.3

$NaH_2PO_4-H_2O$	0.345	กรัม
Na_2HPO_4	1.063	กรัม
NaCl	8.474	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ปรับให้ได้ pH เท่ากับ 7.2 ± 0.3 ด้วย 1 N HCl

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

H. influenzae



H. parainfluenzae

รูปที่ 18 การจำแนก *H. influenzae* และ *H. parainfluenzae* ด้วยแผ่น X-,V-factor

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

1. การคำนวณค่าใช้จ่ายในการเตรียมแอนติเซรุ่ม

1.1. การเตรียมแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* type 1,5,6,19,23 จำนวน 150 มล.

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
กระต่าย 25 ตัวๆ ละ 150 บาท	3,750
อาหารกระต่าย	1,000
อาหารเลี้ยงเชื้อ	1,500
horse serum 500 มล.ๆ ละ 6 บาท	3,000
หลอดเก็บเชื้อขนาด 2 มล. (1000 หลอดๆ ละ 3.75 บาท)	3,750
หลอดแก้วและเครื่องแก้ว	1,000
หลอดฉีดยาขนาด 2.5 มล.พร้อมเข็ม (50 อันๆ ละ 5 บาท)	2,500
กระจกสไลด์และ coverglass	100
น้ำยาและสารเคมี	1,500
น้ำแข็งแห้ง 5 กิโลกรัมๆ ละ 30 บาท	150
ค่าล่วงเวลาคนดูแลกระต่าย	500
รวม	18,750

ดังนั้นแอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* ราคามล.ละ 125 บาท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การเตรียมแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b จำนวน 50 มล.

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
กระต่าย 5 ตัวๆ ละ 150 บาท	750
อาหารกระต่าย	100
อาหารเลี้ยงเชื้อ	2,000
หลอดเก็บเชื้อขนาด 2 มล. (200 หลอดๆ ละ 3.75 บาท)	750
หลอดแก้วและเครื่องแก้ว	500
หลอดฉีดยาขนาด 2.5 มล.พร้อมเข็ม (20 อันๆ ละ 5 บาท)	100
น้ำยาและสารเคมี	2,000
จานเลี้ยงเชื้อ 100 ใบๆ ละ 30 บาท	3,000
รวม	9,200

ดังนั้นแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* ราคามล.ละ 184 บาท

2. การคำนวณค่าใช้จ่ายในการเตรียมชุดทดสอบ

2.1. การเตรียมชุดทดสอบ COA เพียงพอสำหรับ 300 การทดสอบ

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
แอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* (3 มล.ๆ ละ 125 บาท)	375
อาหารเลี้ยงเชื้อ *S.aureus* Cowan I	500
หลอดแก้วและเครื่องแก้ว	700
หลอด centrifuge ขนาด 2 มล. (500 หลอดๆ ละ 3 บาท)	1,500

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
น้ำยาและสารเคมี	500
สี methylene blue	25
รวม	3,600

ดังนั้นชุดทดสอบ COA ราคา 12 บาทต่อ 1 การทดสอบ

2.2. การเตรียมวิธีทดสอบ SG ด้วยแอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* จำนวน 50 การทดสอบ

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
แอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* type b	185
หลอดแก้วและเครื่องแก้ว	500
กระจกสไลด์	50
แท่งพลาสติกสำหรับเกลี่ย	25
น้ำยาและสารเคมี	500
โคมไฟฟ้า	440
รวม	1,700

ดังนั้นวิธีทดสอบ SG ราคา 34 บาทต่อ 1 การทดสอบ

2.3. การเตรียมชุดทดสอบ LA สำหรับ *S.pneumoniae* จำนวน 3000 การทดสอบ

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
เม็ด latex (Difco) (50 มล.ๆ ละ 200 บาท)	10,000

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
แอนติเซรุ่มต่อ *S.pneumoniae* (150 มล.ๆ ละ 125 บาท)	18,750
Protein A-sepharose (10 มล.ๆ ละ 1,000 บาท)	10,000
แผ่นกรองของเครื่อง Amicon ultrafiltration	2,000
แอนติบอดีต่อ IgG และเซรุ่มกระต่ายปรกติ	1,250
หลอด centrifuge ขนาด 2 มล. (2,000 หลอดๆ ละ 3 บาท)	6,000
น้ำยาและสารเคมี	2,000
กระจกสไลด์	1,000
รวม	51,000

ดังนั้นชุดทดสอบ LA สำหรับ *S.pneumoniae* ราคา 17 บาทต่อ 1 การทดสอบ

2.4. การเตรียมชุดทดสอบ LA สำหรับ *H.influenzae* จำนวน 600 การทดสอบ

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
เม็ด latex (Difco) (10 มล.ๆ ละ 200 บาท)	2,000
แอนติเซรุ่มต่อ *H.influenzae* (50 มล.ๆ ละ 184 บาท)	9,200
Protein A-sepharose (10 มล.ๆ ละ 1,000 บาท)	10,000
แผ่นกรองของเครื่อง Amicon ultrafiltration	2,000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
แอนติบอดีต่อ IgG และเซรุ่มกระต่ายปรกติ	500
หลอด centrifuge ขนาด 2 มล. (200 หลอดๆ ละ 3 บาท)	600
น้ำยาและสารเคมี	1,300
กระจกสไลด์	200
รวม	25,800

ดังนั้นชุดทดสอบ LA สำหรับ *H. influenzae* ราคา 43 บาทต่อ 1 การทดสอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิภา รุจิธรรมกุล เกิดเมื่อวันที่ 7 มิถุนายน 2506 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2528 หลังจากสำเร็จการศึกษาแล้วได้เข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาสหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย