*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* และ *Moraxella catarrhalis* เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสำคัญที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจของคนทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ที่สำคัญ ได้แก่ หูชั้นกลางอักเสบ (otitis media), ไซนัสอักเสบ (sinusitis), หลอดลมอักเสบ (bronchitis), ปอดอักเสบ (pneumonia) และปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease) ในกรณีของ serotypeable *H. influenzae* พบเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ก่อโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี ในขณะที่ nontypeable *H. influenzae* (NTHi) พบเป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ก่อโรคหูชั้นกลางอักเสบที่พบทั้งในเด็ก ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ การติดเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจึงนับเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย และเนื่องจากความไม่น่าเชื่อถือของการตรวจแยกเชื้อโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิมประกอบกับเทคนิค PCR ที่ใช้ส่วนใหญ่มุ่งตรวจหาเชื้อเพียงสปีชีส์เดียว หรือสามารถตรวจได้ทีละสปีชีส์ ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวทำให้การศึกษาครั้งนี้มุ่งพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อให้สามารถตรวจแยก *H. influenzae*, *S. pneumoniae* และ *M. catarrhalis* ได้พร้อมกัน อีกทั้งให้สามารถตรวจแยก serotypeable และ nontypeable *H. influenzae* พร้อมกันในขั้นตอนเดียว โดยใช้ primer ทั้งหมด 5 คู่ ได้แก่ frdB-F/frdB-R, HI-1/HI-2, lytA-F/lytA-R, copB-R/copB-R และ RW01/DG74 ผลการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าเทคนิคที่พัฒนานี้มีความจำเพาะสูง โดยสามารถตรวจแยกเชื้อ *H. influenzae*, *S. pneumoniae* และ *M. catarrhalis* ออกจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่พบได้บ่อยในบริเวณระบบทางเดินหายใจของคนได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งสามารถแยก serotypeable *H. influenzae* ออกจาก NTHi ได้อย่างถูกต้องพร้อมกันในขั้นตอนเดียว สำหรับความไวของเทคนิคนี้ที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *H. influenzae*, *S. pneumoniae* และ *M. catarrhalis* พร้อมกันมีค่าความไวเท่ากับ 1 ng และเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของ clinical *H. influenzae*, *S. pneumoniae* และ *M. catarrhalis* isolate ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลของจังหวัดทางภาคเหนือตอนล่าง พบว่า multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพบ *H. influenzae*, *S. pneumoniae* และ *M. catarrhalis* ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด นอกจากนี้ยังสามารถแยก serotypeable *H. influenzae* ออกจาก NTHi ได้อย่างถูกต้องพร้อมกันอีกด้วย เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเป็นเครื่องมือที่มีคุณค่า สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก serotypeable และ nontypeable *H. influenzae*, *S. pneumoniae* และ *M. catarrhalis* ตลอดจนการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อทั้ง 3 สปีชีส์นี้อีกด้วย

*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* are important pathogens of the human respiratory tract in both children and adults. These pathogens are the leading causes for a variety of infectious diseases, including otitis media, sinusitis, bronchitis, pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. While serotypeable *H. influenzae* remains a leading cause of meningitis in children younger than 5 years of age, nontypeable *H. influenzae* (NTHi) has become recognized as a significant etiologic agent of wide ranges of respiratory tract infections, in particular otitis media in children, adults and elderly. The infections caused by these bacteria are thus a major global public health problem including Thailand. Due to an unreliable determination result of conventional culture method and PCR assay can only detect one species or one pathogen at a time, therefore the multiplex PCR was developed in this study. The aim of the development was to simultaneous detect of nontypeable and serotypeable *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*. With 5 primer sets; frdB-F/frdB-R, HI-1/HI-2, lytA-F/lytA-R, copB-R/copB-R and RW01/DG74, the multiplex PCR developed in this study was able to correctly detect all reference strains of *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*, but not other bacteria commonly found in human respiratory tract, demonstrating high specificity. The technique was also capable of differentiating serotypeable *H. influenzae* from NTHi. The sensitivity of detection of strains of *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* DNA was 1 ng. When subjected to test with clinical *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* DNA isolated from patients in the hospitals in a Lower Northern Thailand, the multiplex PCR was able to correctly detect all serotypeable and nontypeable *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*. Together, the multiplex PCR developed in this study provides a valuable tool not only for the diagnosis of infections caused by serotypeable and nontypeable *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis* but also the epidemiology studies.