เนื่องจากข้อจำกัดเกี่ยวกับความไวในการตรวจพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคหูชั้นกลางอักเสบที่อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบดั้งเดิม (conventional culture method) โดยเฉพาะในกรณีที่มี underlying otitis media with effusion ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงได้เลือกเทคนิค multiplex PCR ขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคหูชั้นกลางอักเสบ 3 สปีชีส์คือ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, และ *Moraxella catarrhalis* พร้อมกันในขั้นตอนเดียว เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีความไว ความจำเพาะ และมีความถูกต้องแม่นยำสูง ทั้งยังเป็นการประหยัดเวลา สารเคมี และน้ำยา เนื่องจากเป็นการทำเพียง reaction เดียวพร้อมกัน การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือก primers frdB-F/frdB-R, lytA-F/lytA-R, and CopB-F/CopB-R ที่มีความจำเพาะกับยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ fumarate reductase ใน *H.* influenzae, ยีนที่สร้างสารพิษ autolysin ใน *S. pneumoniae* และยีนที่สร้าง outer membrane protein B ใน *M. catarrhalis* นอกจากนี้ยังมี primer HI-1/HI-2 โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้ตรวจแยกความแตกต่างระหว่าง *H. influenzae* สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลและไม่สร้างแคปซูล และการเพิ่ม primer RW-01/DG74 ซึ่งจำเพาะกับ bacterial 16S ribosomal RNA เพื่อเป็น internal control ทำให้สามารถตรวจสอบความถูกต้องในการทำ multiplex PCR แต่ละครั้งได้ โดยใช้ primers ทั้ง 5 คู่ดังกล่าว Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจแยกเชื้อ *H. influenzae S. pneumoniae*, และ *M. catarrhalis* สายพันธุ์มาตรฐานได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ ทั้งยังสามารถตรวจแยก *H. influenzae* สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลและไม่สร้างแคปซูลออกจากกันได้อย่างถูกต้อง เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะสูงโดยสามารถตรวยแยกเชื้อ *H. influenzae S. pneumoniae*, และ *M. Catarrhalis* ออกจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอื่น ๆ ที่พบได้บ่อยในบริเวณทางเดินหายใจของคนได้ multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูง โดยสามารถตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระดับต่ำสุดที่ 1 ng และเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของ clinical isolate ที่แยกได้จากผู้ป่วยจาก 2 โรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่าง พบว่าให้ผลการตรวจที่ถูกต้องทุกไอโซเลท เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะและความไวสูง จึงนับว่าเป็นเครื่องมือที่มีคุณค่าสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคหูชั้นกลางอักเสยทั้ง 3 สปีชีส์

The limitation of conventional culture methods in detection of bacterial etiology of otitis media has been the low sensitivity. The culture methods have not been able to make clear the pathogenic cascade underlying otitis media with effusion. As such, a multiplex PCR approach was chosen as this technique is highly sensitive and specific and only a single reaction is set up and analyzed, thus saves considerable amounts of time and reagents. In this study, we developed a multiplex PCR for simultaneous detection of three bacterial middle ear pathogens, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis*. Primers frdB-F/frdB-R, lytA-F/lytA-R, and CopB-F/CopB-R targeting the genes fumarate reductase, autolysis and outer membrane protein of *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*, respectively were chosen. Additional pairs of primers, HI-1/ HI-2 was introduced in the multiplex PCR aimed at differentiating capsulated *H. influenzae* from uncapsulated strains. Moreover, the RW01/DG74 primers targeting gene 16S ribosomal RNA of pathogenic bacteria were also included as an internal control for each multiplex PCR amplification. With these selected primers, multiplex PCR developed in this study was able to correctly identify all reference strains of *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *M. catarrhalis*. The technique was able to distinguish capsulated *H. influenzae* from uncapsulated strains. The technique was highly specific since no PCR reaction was observed when tested with DNA extracted from bacteria commonly found in human respiratory tract. The lowest limit of the multiplex PCR to identify genomic DNA of was 1 ng. When subjected to test with clinical bacterial isolates from patients in two hospitals in a lower Northern Thailand, such multiplex PCR was able to identify correctly all clinical isolates. Collectively, the multiplex PCR developed in this study demonstrated high specificity and sensitivity, and thus provides a valuable tool for the identification of these three bacterial middle ear pathogens.