ว.4

รายงานโครงการวิจัยที่ ทพ.6/2530

เรื่อง

การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์ โดยวิธีอินไดเร็ค ฮีแมกกลูติเนชั่น

Indirect haemagglutination test for *Cryptococcus neoformans* antibody in normal sera

โดย

นางศรีวิไล วโรภาสตระกูล
นายนเรศ วโรภาสตระกูล
นายอรุณรัฐ ร่มพฤกษ์

คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ว.ท.b10555126
ว288 ร

อภินันทนาการจาก

กิตติกรรมประกาศ

ในการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเภททั่วไป

ขอขอบพระคุณ คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์จำเป็น, คณบดีคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณสุทิศ จันทร์พันธ์ และคุณประจวบ ชัยมณี ที่ช่วยเหลือให้การศึกษาสำเร็จตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในคณะเทคนิคการแพทย์ ที่ช่วยเหลือในการจัดพิมพ์และทำรูปเล่มจนเสร็จสมบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ในซีรัมของคนปกติที่มาบริจาคโลหิต จำนวน 224 ราย ด้วยวิธี indirect hemagglutination พบว่า 84.1% มีระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 16 และในผู้ป่วยติดเชื้อ cryptococcosis จำนวน 22 ราย พบระดับแอนติบอดีตั้งแต่ 2 ถึง 256 เมื่อเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีระหว่างในซีรัมคนปกติและผู้ป่วยแล้ว พบว่าระดับไตเตอร์ที่เหมาะสม สำหรับการวินิจฉัยโรค cryptococcosis เป็น 16 ซึ่งมีค่าความไว ค่าความจำเพาะ และค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยเป็น 50.00, 83.92 และ 80.89% ตามลำดับ

Abstract

The indirect hemagglutination assay of the antibody level against *Cryptococcus neoformans* was performed on the sera of 224 healthy-donors and of 22 patients who had certain diagnosis as cryptococcosis. The antibody titer 16 or less were found in the sera of 84.1% of healthy donors, however of 22 patients were 2 to 256. According to the comparison of the antibody level in sera of both types, the appropiate titer for the diagnosis of Cryptococcosis was 16 with sensitivity, specificity and accuracy of the diagnosis of 50,00, 83.92 and 80.89% respectively,

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
วัสดุและวิธีการ	4
ผลการวิจัย	6
วิจารณ์ผล	9
เอกสารอ้างอิง	11

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนซีรัมของคนปกติและของผู้ป่วย cryptococcosis ที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่าง ๆ โดยวิธี indirect hemagglutination 7

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy) ของวิธี indirect hemagglutination ที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่าง ๆ 8

บทนำ

Cryptococcus neoformans ทำให้เกิดโรค Cryptococcosis ซึ่งเกิดได้ทั้งในคนและสัตว์ พบได้ในธรรมชาติทั่วไป ในประเทศไทยพบเชื้อนี้ในมูลสัตว์ปีก เช่น มูลนกพิราบ,นกเขา, นกหงส์หยก และโดยเฉพาะในบริเวณที่นกดังกล่าวอาศัยอยู่ถ้าเป็นดินที่ชื้นและไม่ถูกแสงแดดจะมีโอกาสพบเชื้อมากขึ้น(1)

ลักษณะของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* มีรูปร่างกลมคล้ายยีสต์ (yeast like fungi) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-20 ไมครอน ลักษณะพิเศษที่พบคือเชื้อสามารถสร้าง mucinous capsule หุ้มตัวเองได้ทุกสายพันธุ์ ผนังมีความหนาประมาณ 3 เท่าของตัวเชื้อ สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) และเชื้อไม่สร้างไมซีเลียม

การติดต่อส่วนมากเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดดมเชื้อเข้าไป ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ปอด ระยะแรกผู้ป่วยอาจจะไม่แสดงอาการ ยกเว้นความผิดปกติทางภาพถ่ายรังสีทรวงอก หลังจากนั้นผู้ป่วยอาจหายเองหรือบางรายเชื้อจะกระจายไปตามกระแสโลหิตสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยเฉพาะระบบประสาท โดยทั่วไปโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อ Cryptococcus นี้พบในผู้ใหญ่มากกว่าเด็ก (70-80% ของผู้ป่วยทั้งหมดมีอายุมากกว่า 20 ปี) และ 30-50% ของผู้ใหญ่ที่เป็นโรคนั้นจะมีโรคหรือมีภาวะภูมิคุ้มกันพร่องอยู่เดิม จากรายงานส่วนมากมักเกิดพยาธิสภาพที่สมองและเยื่อหุ้มสมองมากกว่าที่ไขสันหลัง จะเกิดในผู้ป่วยที่มีความต้านทานของร่างกายต่ำและมีโรคแทรกของโรคเบาหวาน, Hodgkin's disease, leukemia, moniliasis, reticulum cell sarcoma, lymphoid neoplasm และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาจำพวก steroid นาน ๆ(2)

เมื่อเชื้อราเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางทางกระแสโลหิต จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพได้ 3 แบบดังนี้

แบบที่ 1 เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองแบบ subacute หรือ chronic การอักเสบจะพบบ่อยที่ฐานของสมอง

แบบที่ 2 เกิดการอักเสบของ gray matter ของสมองคือ meningo encephalitis แต่ไม่มีการอักเสบลักษณะหนอง (suppurative inflammation)

แบบที่ 3 เกิด Cryptococcal granuloma มักเกิดจากการรวมตัวของเชื้อราเป็นกลุ่มก้อน มี granulation tissue ของหลอดเลือดรวมอยู่ด้วย

ผู้ป่วยส่วนมากจะมีอาการของเยื่อหุ้มสมองอักเสบเรื้อรังคือ ปวดศีรษะ, คลื่นไส้, อาเจียน, ปวดต้นคอ, มีความดันของน้ำไขสันหลังในสมองสูง, บางรายมีอาการอัมพาตครึ่งซีก หรือความจำเลอะเลือน(3,4,5)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร มีหลายวิธีได้แก่ การตรวจหาเชื้อสาเหตุโดยตรง โดยวิธีย้อมสี india ink, การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการตรวจทาง serology เพื่อตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี

วิธีการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* มีหลายวิธี ได้แก่ วิธี indirect immunofluorescent assay(6), charcoal particle agglutination(7), direct agglutination (8), bentonite flocculation(9), และ indirect haemagglutination(10)

Pollock และ Ward (10) ได้เริ่มพัฒนาวิธี indirect haemagglutination เมื่อปี ค.ศ. 1962 โดยใช้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่โอมาเคลือบด้วย polysaccharide antigen พบว่าสามารถตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ในผู้ป่วย cryptococcosis 2 รายได้ค่าไตเตอร์ที่ 80 และ 320 ต่อมาปี ค.ศ. 1972 Kozel และ Cazin (11,12) ได้เคลือบ cryptococcal polysaccharide antigen บนเม็ดเลือดแดงแกะ แล้วทดสอบหาแอนติบอดี และแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* โดยวิธี indirect haemagglutination และวิธี haemagglutination inhibition พบว่าให้ความไว (sensitivity) ดีกว่าวิธี precipitation และ agglutination

ในการวิจัยนี้ต้องการพัฒนาวิธีการทดสอบ indirect haemagglutination ซึ่งเป็นวิธีทำการทดสอบได้ง่าย อ่านผลชัดเจน ประหยัดเวลา และน้ำยาทดสอบ เพื่อใช้เป็นวิธีในการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ทางห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร และต้องการหาค่าระดับของแอนติบอดีที่เหมาะสม ที่จะใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรค cryptococcosis ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ C. neoformans โดยวิธี Latex agglutination
2. เพื่อทดสอบหาประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นของเชื้อ C. neoformans โดยวิธี Latex agglutination
3. เพื่อศึกษาปริมาณแอนติเจนของเชื้อ C. neoformans ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น cryptococcosis

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

1.1 ตัวอย่างซีรัมคนปกติ

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคโลหิตที่คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 224 ราย เป็นหญิง 107 ราย เป็นชาย 117 ราย อายุ 17-60 ปี แยกซีรัมเก็บที่ -70° ซ. จนกว่าจะนำมาใช้

1.2 ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย Cryptococcosis

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วย Cryptococcosis โดยมี Cryptococcal antigen ในน้ำไขสันหลังให้ผลบวก (วิธี latex agglutination) จำนวน 22 ราย แยกซีรัม เก็บเช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัมคนปกติ

2. Soluble *C. neoformans* antigen

เตรียมแอนติเจนสกัด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. neoformans* (สายพันธุ์ประจำถิ่นที่พบในผู้ป่วยของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) บน Sabouraud dextrose agar (SDA) นาน 4 วัน นำมา suspend ใน phosphate buffer saline pH 7.4 ต้มฆ่าเชื้อที่ 100°ซ. 30 นาที ปั่นแยกเอา supernatant มาใช้เป็น soluble *C. neoformans antigen* นำไปวัดหาปริมาณโปรตีน เก็บแอนติเจนสกัดที่ได้ไว้ที่ 4°ซ. เพื่อนำไปเตรียม sensitized cells

3. ซีรัมควบคุมที่ให้ผลบวก ใช้ซีรัมจากกระต่ายที่ฉีดกระตุ้น *C. neoformans* cell antigen มีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีเท่ากับ 32 (โดยวิธี direct agglutination)

4. วิธีการทดลอง

4.1 วิธีเตรียม sensitized cells

ผสม pack fresh human O cells 1 ส่วนกับแอนติเจนสกัดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (จากการทำ block titration) 1 ส่วน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. 30 นาที โดยเขย่าเบา ๆ ทุก 10 นาที ปั่นล้าง sensitized cell 3 ครั้ง แล้วนำไปเตรียมให้เป็น 0.25% sensitized cells ด้วย 0.2% bovine serum albumin (BSA) ใน phosphate buffer saline ใช้สำหรับเป็น sensitized cell antigen

4.2 วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *C. neoformans* โดยวิธี indirect haemagglutination

- ใช้ 0.2% BSA ใน PBS เป็น diluent ในการเจือจางซีรัมต้าอย่างที่ inactivate ที่ 56°ซ. 30 นาที จาก 1:2, 1:4,....1:128
- ใช้ 50 ไมโครลิตรของซีรัมต้วอย่างที่เจือจางเป็น dilution ต่าง ๆ ผสมกับ 50 ไมโครลิตร sensitized cell antigen
- incubate ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง
- อ่านผลดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้ต้องทำ positive control serum control และ unsensitized cell คาบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

ผลการวิจัย

จากการเก็บซีรัมตัวอย่างจากคนปกติที่มาบริจาคโลหิต ที่คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 224 คน นำมาหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยวิธี indirect haemagglutination พบว่ามีระดับของแอนติบอดีไตเตอร์อยู่ในช่วงระหว่าง <2 ถึง 128 มีค่าเฉลี่ย (geometric mean titer) เท่ากับ 5.8 และจากซีรัมตัวอย่างของผู้ป่วย cryptococcosis (มีแอนติเจนให้ผลบากในน้ำไขสันหลังด้วยวิธี latex agglutination) จำนวน 22 ตัวอย่าง พบระดับแอนติบอดีไตเตอร์อยู่ในช่วงระหว่าง 2 ถึง 256 มีค่าเฉลี่ย (geometric mean titer เท่ากับ 20.9) โดยมีลักษณะการกระจายของจำนวนตัวอย่าง และเปอร์เซนต์สะสมในแต่ช่วงแอนติบอดีไตเตอร์ตามตารางที่ 1

การตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้วินิจฉัยผู้ป่วยโรค cryptococcosisทำโดยการคำนวณหาค่าความไว (sensitivity), ค่าความจำเพาะ (specificity) และค่าความถูกต้อง (accuracy) สำหรับการวินิจฉัยโรค ตามตารางที่ 2 พบว่าในการศึกษานี้ ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ที่เหมาะสมคือ 16 ซึ่งจะให้ค่าความไว, ค่าความจำเพาะ และค่าความถูกต้องเป็น 50.00, 83.92 และ 80.89 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนซีรัมของคนปกติ และของผู้ป่วย (cryptococcosis ที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่าง ๆ โดยวิธี indirect hemagglutination

ค่าแอนติบอดีไตเตอร์	ซีรัมคนปกติ		ซีรัมผู้ป่วย Cryptococcosis	
	จำนวน (ราย)	% สะสม	จำนวน (ราย)	% สะสม
<2	41	18.3	0	0
2	39	35.8	2	9.1
4	31	49.6	2	22.7
8	43	68.9	2	31.8
16	34	84.1	4	50.0
32	20	93.0	5	72.8
64	14	99.2	3	86.4
128	2	100.0	0	86.4
256	0	100.0	3	100.0
รวม	224	100.0	22	100.0
ค่าเฉลี่ยไตเตอร์ (Geometric Mean)	5.8		20.9	

ตารางที่ 2 : แสดงค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้อง (accuracy)ของวิธี indirect hemagglutination ที่ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่าง ๆ

ค่าแอนติบอดีไตเตอร์	ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	ความถูกต้อง (%)
< 2	100	18.30	25.61
2	90.91	35.71	40.65
4	77.27	49.55	52.03
8	68.82	68.75	68.70
16	50.00	83.92	80.89
32	27.27	92.86	86.99
64	13.64	99.11	91.46
128	13.64	100.00	92.28
256	0.00	100.00	91.06

สรุปและวิจารณ์ผล

ในการตราจหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ด้วยวิธี indirect hemagglutination (10) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะดีกว่าวิธี direct agglutination, complement fixation และ precipitation (12) โดยในการศึกษาของ Kozel and Cazin ได้ใช้ purified polysaccharide ที่สกัดจากเชื้อ *C. neoformans* เคลือบบนเม็ดเลือดแดงแกะที่ treat ด้วย chromium chloride ($CrCl_3.6H_2O$) พบว่า sensitized cell ที่ใช้เป็นแอนติเจนนั้นให้ความไวสูง (12) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ Crude soluble antigen ที่สกัดจากเชื้อ *C. neoformans* โดยการต้มที่ 100°ซ. 30 นาที แล้วนำมาเคลือบบนเม็ดเลือดแดงของคนหมู่โอ โดยตรง(10) พบว่าไตเตอร์ที่ใช้เป็น cut off titer ที่ไตเตอร์ 16 จะให้ผลความไวของการทดสอบ, ความจำเพาะ และความถูกต้องเป็น 50.0, 83.92 และ 80.89% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าพอประมาณที่ใช้ในการจำแนกผู้ป่วยโดยอาศัยการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะ

วิธี indirect hemagglutination ที่ใช้การศึกษานี้ มีข้อดี คือ วิธีการทดสอบง่าย อ่านผลชัดเจน ไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการทดลอง แต่วิธีที่ใช้ในการศึกษานี้มีข้อจำกัดของวิธีอยู่หลายประการคือ sensitized ที่เตรียมได้ ไม่สามารถเก็บไว้ได้นานเนื่องจากใช้ fresh human O cells มาเตรียมเป็น sensitized cell แอนติเจนที่สกัดเป็น crude extracted antigen ซึ่งในแต่ละ lot ที่เตรียมแอนติเจนสกัดนั้น อาจได้ปริมาณโปรตีนและ polysaccharide ไม่เท่ากัน ทำให้ต้องไตเตรทหาปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสมที่จะใช้เคลือบบนเม็ดเลือดแดงทุกครั้ง

ในการทดลองนี้ได้พยายามเคลือบ crude extracted antigen บนเม็ดเลือดแดงของคนหมู่โอที่ treat ด้วย chromium chloride และ treat ด้วย glutaraldehyde แต่พบว่าทั้ง unsensitized cell และ sensitized cell มี autoagglutination ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ treat เม็ดเลือดแดงยังไม่เหมาะสม หรือ pH ของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบยังไม่เหมาะสม ซึ่งถ้าจะพัฒนาวิธีการนี้ต้องมีการศึกษาต่อไป

ในการตราจหาระดับแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ในคนปกติจะพบว่า สามารถตราจพบระดับแอนติบอดีได้ตั้งแต่ <2 ถึง 128 โดยพบว่าที่ไตเตอร์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 16 นั้น สามารถตราจพบระดับแอนติบอดีในคนปกติได้ 84.1 เปอร์-

n 63775

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เซนต์ ซึ่งในการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ ไม่ได้สอบถามประวัติว่าเคยมีการติด เชื้อ cryptococcosis มาก่อนหรือไม่ หรืออาจเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาร่วมเนื่องจากเชื้ออื่น ๆ เช่น *Candida albicans* และ Torulopsis species เป็นต้น(14) ซึ่งต้องมีการศึกษาถึงปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อโรคอื่น ๆ โดยวิธี indirect haemagglutination นี้ต่อไป นอกจากนี้เชื้อ *C. neoformans* ยังเป็นเชื้อที่เป็น opportunistic organism ซึ่งในคนปกติที่ได้รับเชื้อโดยไม่มีอาการของโรคสามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองได้

ระดับแอนติบอดีในผู้ป่วย cryptococcosis จำนวน 22 ราย พบระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ 2 ถึง 256 โดยมีค่า geometric mean titer เท่ากับ 20.9 ซึ่งสูงกว่าในคนปกติ (geometric mean titer เท่ากับ 5.8) แต่ระดับแอนติบอดีพบได้ในช่างระหว่างไตเตอร์ 2 ถึง 256 ซึ่งสามารถพบได้ในคนปกติเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่พบแอนติเจนในน้ำไขสันหลังให้ผลบวกทั้ง 22 ราย โดยไม่ได้ดูประวัติย้อนหลังถึงระยะเวลาการเกิดอาการของโรค โดยถ้าผู้ป่วยที่เริ่มมีอาการของ cryptococcosis การตอบสนองของแอนติบอดีจะได้ไตเตอร์ต่ำ, การตอบสนองของร่างกาย host ต่อแอนติเจนของ *C. neoformans* ในแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกัน, และ/หรือการสร้างแอนติบอดีตอบสนองเกิดขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็ว

จากผลการศึกษานี้ แม้ว่าวิธี indirect hemagglutination ที่ใช้ในการทดลองนี้ ยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ ที่จะใช้เป็นวิธีทดสอบประจำวันในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตร แต่ข้อมูลที่ได้ น่าจะมีประโยชน์ในการอ้างอิงสำหรับการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับวิธีทดสอบเพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ *Cryptococcosis* ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ และเสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร, อุบัติการของเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์ ในมูลนกเขา จากอำเภอจะนะ สงขลา. ว.สงขลานครินทร์ 2526; 5:321-323.

2. จันทร์เกษม อ่างแก้ว. การอักเสบของเยื่อหุ้มไขสันหลังจากเชื้อรา *Cryptococcus neoformans*. ว. กรมการแพทย์ 2530; 10:535-537.

3. วิโรจน์ พงษ์พันธุ์เลิศ, สุวรรณี พันเจริญและศศิธร ลิขิตนุกูล. เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อคริปโตคอคคัส. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2531; 6:593-598.

4. พรรณี กาญจนะดูหะ. คริปโตคอคโคซิสของระบบประสาท. ว.กรมการแพทย์ 2528; 7:507-511.

5. วีรจิตต์ โชติมงคล. รายงานผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์ ที่มีอาการตามัว และหูหนวกอย่างรวดเร็ว ร่วมกับมีเซลอีโอซิโนฟิลในน้ำไขสันหลัง. ศรีนครินทร์เวชสาร 2529; 4:303-305.

6. Vogel RA, Sellers TF, Woodward P. Fluorescent antibody Techniques applied to the study of human cryptococcosis. JAMA:1961, 178:921-932.

7. Gordon MA, Lapa E. Charcoal particle agglutination test for detection of antibody to ***Cryptococcus neoformans***. A preliminary report. Am. J. Clin Pathol. 1971; 56:354-359.

8. Kaufman L, Blumer S. Value and interpretation of serological tests for diagnosis of cryptococcosis. Appl. Microbiol. 1986; 16: 1907-1912.

9. Kimball HR, Hasenclever HF, Wolff SM. Detection of circulating antibody in human cryptococcosis by means of a bantonite flocculation technique. Am Rev. Respir. Dis. 1967; 95: 631-639.

10. Pollock AO, Ward LM. A haemagglutination test for Cryptococcus. Am. J. Med. 1962; 32:6-15.

11. Kozel TR. Cazin J. Non encapsulated varient of *Cryptococcus neoformans*. I Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide. Infect. Immun. 1971; 3:287-294.

12. Kozel TR, Cazin J. Immune response to *Cryptococcus neoformans*. soluble polysoccharide. Infect Immun. 1972; 5:35-41.

13. Mackenzie DWR. Serodiagnosis. In. Fungi Pathogenic for Humans and animals. edi ed by Howard DH, Howard LF. New York and Basel. Marcel Dekker, Inc. 1983 pp. 167.

14. Palmer DF, Kaufman Leo, Kaplan W, Cavallaro J. Serodiagnosis of mycotic diseases. Charles C Thomas Publisher. Spring field. Illinois USA 1977.

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

๗๗
QR
201
.T5
ท๒๖๑