

## เอกสารอ้างอิง

1. Jones, H.W., and G.S. Jones, Novak's Textbook of Gynecology, pp.264-265, 10<sup>th</sup> Ed. William and Wilkins, 1981.
2. Shepard, M.C. "The recovery of Pleuro-pneumoniae-like organisms from Negro-men with and without nongonococcal urethritis," American Journal of Syphilis, Gonorrhea and Venereal Diseases, 38, 113-124, 1954.
3. Cassel, G.H. and B.C. Cole. "Mycoplasma as agent of human disease. New.Engl. J. Med., 304-389, 1981.
4. Kundsinn, R.B. "Mycoplasma in humans significance of Ureaplasma urealyticum," Heath Lab Sci., 13, 144, 1976.
5. Shepard, M.C. "Nongonococcal urethritis associated with human strains of T-mycoplasma," JAMA, 211, 1335-1340, 1970.
6. Bowie, W.R., S-P Wang, I.R. Alexander., et al. "Etiology of non-gonococcal urethritis : Evidence for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum," J. Clin, Invest, 59, 735-742, 1977.

7. Oriel, J.D. "Role of genital mycoplasma in nongonococcal urethritis and prostatitis," Sex. Trans. Dis., 10, 263-270, 1983.
8. Taylor-Robinson, D. "The role of mycoplasmas in nongonococcal urethritis : a review," Yale. Biol. Med., 56, 537-543, 1983.
9. Crucea, E., D. Botez., S. constantinescu., et al. "Genital Mycoplasmas and Chlamydia in men with urethritis," Arch. Roum. Patho. Exp. Microbiol., 42, 25-30, 1983.
10. Taylor-Robinson, D., G.W. Csonka., M.J. Prentice. "Human intra-urethral inoculation of Ureaplasmas," Quart. J. Med., 46, 306-326; 1977.
11. Prentice, M.J., Taylor-Robinson, D., Csonka, G.W. "Non-specific urethritis. A placebo-controlled trial of minocycline in conjugation with laboratory investigation," Br.J.Vener.Dis., 52, 269-275, 1976.
12. Hunter, J.M., I.W. Smith., J.E. Pentherer, J.E. "*Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* in men attending asexually transmitted disease clinic," Br. J. Vener. Dis., 57, pp.130-133, 1981.

13. Coufalik, E.D., D. Taylor-Robinson., G.W. csonka.  
"Treatment of nongonococcal urethritis with rifampicin as a means of defining the role of *Ureaplasma urealyticum*," Br. J. Vener. Dis, 55, 36-43, 1979.
14. Embree, J.E., V.W. Krause, J.A Embil., and S.M. Donald "Placental infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* : clinical correlation," Obstet Gynecol., 56, 475-481, 1980.
15. Cassell, G. H., R. O. Davis., K.B. Waites., M.B. Brown., P.A. Marriott.,S. Stagno., and J.K. Davis. "Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation potential effect on outcome of pregnancy," Sex. transm. Dis., 10, 294-302, 1983.
16. Foulon, W., A. Naessens., M. Dewaele., S. Lauwers., and J.J. Amy. "Chronic *Ureaplasma urealyticum* amnionitis associated with abruption placentae," Obstet. Gynecol., 68, 280-282, 1986.
17. Kundsın, R.B., S.G. Driscall,. R.R. Monson., C. Yeh., S.A. Bianco., W.D.Cochran."Association of *Ureaplasma urealyticum* in the placenta with perinatal morbidity and mortality," N. Engl. J. Med., 310(15), 941-945, 1984.

18. Iwasaka, T., T. Wada., Y. Kidera., H. Sugimori." Genital mycoplasma colonization in neonatal girls," Acta Obstet Gynecol Scand., 65(3), 269-272, 1986.
19. Gnarpe, H., J. Friberg. "T-mycoplasmas on spermatozoa and infertility," Nature, 245, 97, 1973.
20. Busolo, F., R. Zanchetta." The effect of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* on hamster eggs in vitro penetration by human spermatozoa," Fertile steril., 43, 110-114, 1985.
21. Upadhyaya, M., B.M. Hibbard., S.M. Walker. "The effect of *Ureaplasma urealyticum* on semen characteristics," Fertile steril, 41(2), 304-308, 1984.
22. Taylor-Robinson, D. "The male reservoir of *Ureaplasma urealyticum*," Pediatr. Infect. Dis, 5(6 suppl), S234-S235, 1986.
23. Pettersson, S., J.E. Brorson., L. Grenabo., and H. Hedelin. "*Ureaplasma urealyticum* in infections urinary tract stones," Lancet, 1, 526-527, 1983.
24. Hedelin, H., J.E. Brorson., L. Grenabo., and S. Pettersson. "*Ureaplasma urealyticum* and upper urinary tract stones," Br. J. Urol., 56, 244-249, 1984.

25. McCormack, W.M., P.C. Almeida. P.E. Baily., E.M. Grady., and Y-H. Lee. Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasma," JAMA, 221, 1375-1377, 1972.
26. McCormack, W.M., B. Rosner. S. Alpert. J.R. Evrard, V.A. Crocket., and S.H. Zinner. " Vaginal colonization with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*," Sex. trans. Dis., 13, 67-70, 1986.
27. McCormack, W.M., Y-H. Lee., and S.H. Zinner. "Sexual experience and urethral colonization with genital mycoplasmas: a study in normal men," Ann. Int. Med., 78, 696-698, 1973.
28. Iwasaka, T., T. Wada, Y. Kidera., and H. Sugimori. "Hormonal status and mycoplasma colonization in the female genital tract," Obstet. Gynecol., 68, 263-270, 1986.
29. Robertson, J.A., and G.W. Stenke. " Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolation from humans," J. Clin. Microbiol., 15, 873-878, 1982.

30. Shepard, M.C. "Quantitative relationship of *Ureaplasma urealyticum* to the clinical course of nongonococcal urethritis in the human male," Les Colloques de l'Institut National de la sante et de la Recherche Medicale les Mycoplasmes /Mycoplasmas. Inserm, 33, 375-380, 1974.
31. Piot, P. "Distribution of eight serotypes of *Ureaplasma urealyticum* in case of nongonococcal urethritis and of gonorrhoea, and in healthy persons," Br. J. Vener. Dis., 52, 266-268, 1976.
32. Black, F.T. "Modificaitons of the growth inhibition test and its application to human T-mycoplasmas," Appl. Microbiol., 25, 528-533, 1973.
33. Shepard, M.C., and C.D. Lunceford. "Serological typing of *Ureaplasma urealyticum* isolates from urethritis patients by an agar growth inhibition method," J. Clin. Microbiol., 8, 566-574, 1978.
34. Cracea, E., S. Constantinescu., M. Lazer. "Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolates from patients with nongonococcal urethritis and gonorrhoea and from asymptomatic urethral carriers," Sex.transm. Dis., 12(4), 219-223, 1985.

35. Naessens, A., W. Foulon., J. Breynaert., and S. Lauwers. "Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complication," J. Clin. Microbiol., 26, 319-322, 1988.
36. ผ่องพรรณ นันทากิสุกฎิ, ทัสสนี นุชประยูร, กาญจนา หริ่มเพ็ง และ องอาจ วิพชศิริ "อัตราการติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* และ *Ureaplasma urealyticum* ในผู้ป่วยชายที่เป็นโรคหนองในเทียม," จุฬาลงกรณ์เวชสาร, ฉบับพิเศษ 2533, 34:18.
37. Kuvanont, K., A. Chitwarakorn., C. Rochananond., M. Kreaurat, C. Ariyarit, P. Singharaj, K. Panikabutra and D.W. Taylor. "Etiology of urethritis in Thailand," Sex. Transm. Dis. 16, 137-140, 1989.
38. Victor, L. "The antimicrobial drugs," Antibiotics in laboratory medicine, Second Edition, 195-220, 1986.
39. Stimson, J.B., J. Hale., W.R. Bowie., K.K. Holmes. "Tetracycline-resistant *Ureaplasma urealyticum*, a cause of resistant urethritis," Ann. Intern. Med., 94, 192-194, 1981.
40. Gorge, E.K., F.D. Cartwright., and M.C. Robert. "Agar dilution method for determination of antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum*." Pediatr. Infect. Dis., 5(6), S332-S334, 1986.

41. Shepard, M.C., C.D. Lunceford. "Effect of pH on human mycoplasma strains," J. Bacteriol., 89, 265-270, 1965.
42. Shepard, M.C., and C.D. Lunceford. "Occurance of urease in T-strains of *Mycoplasma*," J. Bacteriol., 93, 1513-1520, 1967.
43. Ford, D.K., and J. MacDonald. "Influence of urea on the growth of T-strain *Mycoplasmas*," J. Bacteriol. 93, 1509-1512, 1967.
44. Kenny, GE., and F.D. Cartwright. "Effect of urea concentration on growth of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma)," J. Bacteriol., 132, 144-150, 1977.
45. Shepard, M.C., C.D. Lunceford., D.K. Ford., etal. "*Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov: Proposed nomenclature of the bacteria T (T-strain) *Mycoplasma*," Int.J. Syst. Bacteriol., 24, 160-171, 1974.
46. Taylor-Robinson, D. and R.N. Gourlay, "Genus II *Ureaplasma*," Bergey's manual of systematic bacteriology. (Krieg, N.R. et al, eds) Vol 1, 770-775, William and Willkin, 1981.



47. Tully, J.G. and S. Razin, "The Mollicutes. Mycoplasmas and Ureaplasmas," CRC Handbook of microbiology. (Laskin, A.I., H.A. Le chevalier eds.) Vol 1, 417-443.
48. Shepard, M.C. *Ureaplasma urealyticum*" Overview with emphasis on fetal and maternal infections," Ann. NY Acad Sci, 549, 48-55, 1988.
49. Shepard, M.C., C.D. Lunceford "Urease color test medium U9 for the detection and identification of T-mycoplasma in clinical material, Appl. Microbiol, 20, 539-543, 1970.
50. Shepard, M.C., and C.D. Lunceford, "Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T-mycoplasmas) in primary cultures of clinical material," J. Clin. Microbiol, 3, 613-625, 1976.
51. Shepard, M.C., R.S. Combs "Enhancement of *Ureaplasma urealyticum* growth on a differential agar medium (A7B) by a polyamine, putrescine," J. Clin. Microbiol, 10, 931-933, 1979.
52. Shlomo, R. "Characterization of membranes lipids" In Method in Mycoplasmaology. (Shmuel, R., G.T. Joseph eds.) Vol1, pp. 269-275 Academic Press. New York. 1983.

53. Kenny, G.E. "Antigenic determinants. In The Mycoplasmas" (M.F. Barile and S.Rasin, eds.) Vol 1, 351-384 Academic Press, New York, 1979.
54. Lin, J.S., E.H. Kass, "Fourteen serotypes of *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) demonstrated by the complement-dependent mycoplasmacidal test," Infection, 8, 152-155, 1980.
55. Purecell, R.H., D. Taylor-Robinson, D.Wong., and R.M. Chanock. "Color test for the measurement of antibody to T-strain mycoplasmas," J.Bacteriol, 92, 6-12, 1966.
56. Robertson, J.A., and G.W. Stemke. "Modified metabolic inhibition test for serotyping strains of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma)," J.Clin. Microbiol, 9, 673-676, 1979.
57. Black, F.T., and a Krogsgaard-Jensen. "Application of indirect immunofluorescence, indirect haemagglutination and polyacrylamide-gel electrophoresis to human T-mycoplasmas," Acta. Pathol.Microbiol. Scand. Sect. B., 82, 345-353, 1974.
58. Quinn, P.A., L.U. Arshoff., and H.C.S. Li. "Serotyping of *Ureaplasma urealyticum* by immunoperoxidase assay," J. Clin. Microbiol., 13(4), 670-676, 1981.

59. Shmuel, R. and Y. David, "Genetic relatedness among *Ureaplasma urealyticum* serotypes (serovars)," Pediatr. Infect. Dis, 5, S 300- S 304, 1986.
60. Mouches, C., D. Taylor-Robinson, L. Stipkovits, et al. "Comparison of human and animal ureaplasmas by one- and two-dimensional protein analysis on polyacrylamide slab gel," Ann Microbiol, 132B, 171-196, 1981.
61. Klein, J.O., D. Buckland, M. Finland, "Colonization of newborn infants by mycoplasmas." N. Engl. J. Med., 280, 1025-1030, 1969.
62. Foy. H.M., G.E. Kenny., E.M. Levinsohn., et al. "Acquisition of mycoplasmas and T-strains during in fancy," J. Infect. Dis, 121, 579-587, 1970.
63. Holmes, M.J., P.M. Furr., D. Taylor-Robinson. "The persistence of mycoplasmas in the urogenital tract of men in the Antarctic," J. Hyg. (Cambridge), 72, 355-363, 1974.
64. Viarengo, J., F. Hebrant, P. Piot "Ureaplasma *urealyticum* in the urethra of healthy men," Br. J. Vener. Dis, 56, 169-172, 1980.
65. Shepard, M.C., G.K. Masover. "Special features of ureaplasmas," In The Mycoplasmas (Barile, M.F. S. Razin. eds.) Vol 1. 451-94 Academic Press, New York, 1979.

66. Stalheim, O.H.V., S.H. Proctor, J.E. Gallagher.  
"Growth and effects of ureaplasmas (T-mycoplasmas) in bovin oviductal organ cultures," Infect Immun, 13, 915-925, 1976
67. Shepard, M.C., C.E. Alexander., C.D. Lunceford., et. al. "Possible role of T-strain mycoplasma in nongonococcal urethritis : A sixth venercal disease," JAMA, 188, 729-735, 1964.
68. Shepard, M.C. " Cultivation and properties of T-strains of Mycoplasma associated with non-gonococcal urethritis." Ann New Acad. Sci, 143 (Arte), 505-514, 1967.
69. Csonka, G.W., R.J. Spilzer. "Lincomycin, non-gonococcal urethritis, and mycoplasmata," Brit.J.Vener.Dis. 45, 52-54, 1969.
70. Taylor-Robinson, D., G.,W. Csonka. "Laboratory and clinical aspects of mycoplasmal infections of the human genitourinary tract," In Recent Advances in Sexually Transmitted Diseases. (Harris J.R.W. ed) London, Churchill Livingstone, 151-186, 1981.
71. Lee, Y-H, P.I. Tarr., J.R. Schumacher., etal.  
"Reevaluation of the role of T-mycoplasmas in nongonococcal urethritis," Sex Transm Dis, 3, 25-28, 1976.

72. Grenabo, L., H.Hedelin., and S.Pettersson. "Urinary infection stones caused by *Ureaplasma urealyticum* : A review," Scand J. Infect.Dis, Suppl 53, 46-49, 1988.
73. Black, F.T. "Serological methods for classification of human T-mycoplasmas," Fifth Internat Congress Inf. Dis, 1, 407-411, 1970.
74. Quinn, P.A., S. Rubin., D.M. Nocilla., S.E. Read., and M. Chipman, "Serological evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in neonatal respiratory disease," Yale.J.Biol. Med, 56: 565-572, 1983.
75. Quinn, P.A., A.B. Shevchuck., J. Shuber, K.I. Lie., E.Ryan., M. Shev., and M.L. Chipman. "Serologic evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss," Am.J. Obstet. Gynecol., 145, 245-250, 1983.
76. Kenny, G.E. "Mycoplasmata in Manual of Clinical Microbiology" (E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hauster, j.r., and J.P. Traant, eds) 3<sup>rd</sup> ed, 365-370. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 1980.

77. Smith, T.F., G.R. Weed., G.,R. Pettersen., and J.W. Segura. "Recover of Chlamydia and genital mycoplasma transported in sucrose phosphate buffer and urease color test medium," Health Lab Sci, 14, 30-34, 1977.
78. Ford, D.K. "Culture of human genital" T-strain" pleuropneumonia - like organisms," J. Bacteriol, 84, 1028-1034, 1962.
79. Shepard, M.C. "Human Mycoplasma infections." Health Lab Sci, 3, 163-169, 1966.
80. Sayed, I.A., G.E. Kenny. "Effects of reducing agents, catalase, and reuse of medium on toxicity of media for growth of *Ureaplasma urealyticum*," J. Infect. Dis, 139, 720-724, 1979.
81. Robertson, J.A. "Bromothymol blue broth; improve medium for detection of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain mycoplasma)," J. Clin. Microbiol., 7, 127-132, 1978.
82. Piot, P. "Comparison of growth inhibition and immunofluorescence tests in serotyping Clinical isolates of *Ureaplasma urealyticum*." Br. J. Vener. Dis, 53, 186-189, 1977.

83. Robertson, J.A, J.E. Coppola., and O.R. Heisler.  
"Standardized method for determining antimicrobial susceptibility of strains of *Ureaplasma urealyticum* and their response to tetracycline, erythromycin and rosaramycin." Antimicrob. Agents. Chemother., 20, 53-58, 1981.
84. Aznar, J., M.C. Caballers, M.C. Lozano, C. de Miguel, J.C. Palomares, and E.J. Perea. 1985. Activities of new quinoline derivatives against genital pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 27:76:78.
85. Taylor-Robinson, D., and W.M. McCormack "The genital mycoplasma" N.Engl.J.Med, 302, 1003-1010, 1063-1067, 1980.
86. Hewish, M.J., D.F. Birch, and K.F. Fairley.  
"*Ureaplasma urealyticum*" serotypes in urinary disease", J.Clin.Microbiol, 23, 149-154, 1986.
87. Ford, D.K. "Relationships between mycoplasma and the etiology of nongonococcal urethritis and Reiter's syndrome", Ann.N.Y.Acad.Sci., 143, 501-504, 1967.
88. Fodor, M. "Difference in the virulence of *Ureaplasma urealyticum* isolates, "Acta Microbiol.Acad. Sci.Hung, 27, 161-169, 1980.

89. Brich, D.F., K.F. Fairley., and E.R. Pavillard.  
"Unconventional bacteria in urinary tract disease:  
*Ureaplasma urealyticum*", Kidney Int., 19,  
58-64, 1981.
90. Stemke, G.W. and J.A. Robertson. "Modified colony  
indirect epifluorescence test for serotyping  
*Ureaplasma urealyticum* and an adaption to  
detect common antigenic specificity", J.Clin.  
Microbiol., 14, 582-584, 1981.
91. Lin, J.S.L., M.I. Kendrick, and E.H. Kass. "Serologic  
typing of human genital T-mycoplasma by a  
complement-dependert mycoplasmocidal test", J.  
Infect.Dis., 126, 658-+663, 1972.
92. Ford, D.K. "Serum antibody levels against T-  
mycoplasmas in two North American Indian  
populations", Arthritis Rheum, 19, 1328-1332,  
1976.
93. Purcel, R.H., R.M. Chanack., and D. Taylor-Robinson  
"Serology of the mycoplasmas of man", In L.  
Hayflick (ed.), The mycoplasmatales and the  
L-phase of bacteria. Appleton Century Crofts,  
Newyork, pp 221-264, 1969.



94. Margareta, R., and H.O. Hollander. "The vitro comparison of the activity of doxycycline, tetracycline, erythromycin and a new macrolide, CP 62993, against *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*", Scand.J.Dis., 53, 12-17, 1988.
95. Harrison, R.F., J. DE. Louvois, M. Blades, and R. Hurley. "Doxycycline treatment and human infertility", Lancet., 15, 605-607, 1975.
96. Ford, D.K., J.R. Smith. "Nonspecific urethritis associated with a tetracycline-resistant T-mycoplasmas," Br. J. Vener. Dis., 50, 373-374, 1974.
97. Davis, J.W., and B.A. Hanna. "Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Microbiol., 13(2), 320-325, 1981.
98. Smith, T.F. "In vitro susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to rosaramicin", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16, 106-108, 1979.
99. Taylor-Robinson, D., and P.M. Furrs. "Clinical antibiotic resistance of *Ureaplasma urealyticum*" Pediatr. Infect. Dis., 5, S335-S337, 1986.
100. Roberts, M.C., and G.E. Kenny. "Tet M tetracycline-resistant determinants in *Ureaplasma urealyticum*." Pediatr. Infect. Dis., 5, S338-S340, 1986.

## ภาคผนวก ก.

### อาหารเลี้ยงเชื้อ, น้ำยาและสารเคมีต่างๆ

- Bromothymol blue (BDH, England.)
- Doxycycline hydrochloride (sigma, Mo., USA.)
- Erythromycin (sigma, Mo., USA.)
- Horse serum (Gibco, Grand Island, N.Y., USA.)
- Hydrochloric acid (HCl) (E. Merck, Darmstadt, W. Germany.)
- L-Cysteinium Chloride (monohydrate) (E. Merck, Darmstadt,  
W. Germany.)
- Minocycline hydrochloride (Sigma, Mo., USA.)
- Mycoplasma broth base (Frey) (Gibco, Madison, USA.)
- Penicillin-G sodium salt (Benzylpenicillin) (sigma, Mo.,  
USA.)
- Phenol red (E. merck, Darmstadt, W. Germany.)
- Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (E. Merck,  
Darmstadt,  
W. Germany.)
- Putrescine dihydrochloride (Sigma, Mo., USA.)
- Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) (E. Merck, Darmstadt, W. Germany.)
- Sodium chloride (NaCl) (E. merck, Darmstadt, W. Germany.)
- Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (E. Merck,  
Darmstadt,  
W. Germany.)
- Sodium hydroxide (NaOH) (BDH, England.)
- Tetracycline hydrochloride (Sigma, Mo., USA.)
- Urea (May and Baker, Dagenham, England.)

Ureaplasma differential basal agar medium (Gibco, Madison,  
USA.)

Yeast extract (Difco, Detroit, Michigan, USA.)

### วัสดุวิทยาศาสตร์

Filter paper disk, Whatman No.1 (Whatman, Maidstone,  
England.)

Membrane filters (Whatman, Maidstone, England.)

Microtiter plate (96 หลุม; U plate) (Nunc, Roskilde,  
Denmark.)

Syringe (disposable) (Terumo, Tokyo, Japan.)

### เครื่องแก้ว

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

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

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

Glass Syringe (Fortuna, W. Germany)

Pasteur pipette (Kimble, Ohio, USA.)

Petri dish (Pyrex, Corning, N.Y., USA.)

Serological pipette (Witeg, West Germany.)

หลอดทดลองและวัสดุพลาสติก

Centrifuge tube, 250ml (Nunc, Roskilde, Denmark.)

Centrifuge tube, 10ml (Nunc, Roskilde, Denmark.)

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

Microcentrifuge tube (Beckman, California, USA.)

Pipette tip (Finntip, Helsinki, Finland.)

Plastic boxes

อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

Automatic pipette (Gilson, Lyon, France.)

Dispenser (Hornilton, Bonadiz, Switzerland.)

Forcep (Pro-med, West Germany.)

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

Deep freezer (Revco, North Carolina, USA.)

Incubator (Memmert, Schwabach, W. Germany.)

Microscopes (Bright field) (Olympus, Tokyo, Japan.)

Refrigerated centrifuge (Tomy Seiko, Japan.)

Sterio microscopes (Nikon, Japan.)

Sonicator (Heat system ultrasonic processor) (Branson,  
Danbury, USA.)

Water bath (Memmert, Schwabach, W. Germany.)

## ภาคผนวก ข.

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *U. urealyticum*

#### 1. การเตรียม *Ureaplasma* differential agar medium (A7B)

|                              |     |      |
|------------------------------|-----|------|
| Pancreatic digest of casein  | 17  | กรัม |
| Papaic digest of soy protein | 3   | กรัม |
| Dextrose                     | 2.5 | กรัม |
| Potassium phosphate dibasic  | 2.5 | กรัม |
| Sodium chloride              | 5.0 | กรัม |
| Managanous sulfate           | 0.2 | กรัม |
| Putrescine                   | 1.5 | กรัม |
| Agar                         | 10  | กรัม |
| น้ำกลั่น                     | 750 | มล.  |

ปรับ pH เป็น 5.5 ด้วย 2 N HCl autoclave 121°C,  
15 นาที กึ่งให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 50°C แล้วเติม

|                                    |     |     |
|------------------------------------|-----|-----|
| Horse serum                        | 200 | มล. |
| 25% Yeast extract                  | 10  | มล. |
| 10% Urea                           | 10  | มล. |
| Isovitalex หรือ Bangrak enrichment | 5   | มล. |
| 4% L-cysteine HCl                  | 2.5 | มล. |
| Penicillin G (1,000,000 U/ml)      | 10  | มล. |

ผสมให้เข้ากันเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง  
กลาง 60 มม. จาน ละ 8 มล. เก็บที่ 4°C

2. การเตรียม Urease color test medium (U9 broth)

|                              |     |      |
|------------------------------|-----|------|
| <i>Mycoplasma</i> broth base | 21  | กรัม |
| น้ำกลั่น                     | 950 | มล.  |

ปรับ pH เป็น 5.5 ด้วย 2 N HCl autoclave 121°ซ, 15 นาที  
ทิ้งให้เย็นแล้วเติม

|                               |    |     |
|-------------------------------|----|-----|
| Horse serum                   | 40 | มล. |
| 10% Urea                      | 5  | มล. |
| 2% Phenol red                 | 1  | มล. |
| Penicillin G (1,000,000 u/ml) | 10 | มล. |

ปรับ pH เป็น 6.0 ± 0.2 ด้วย 2 NHCl

ผสมให้เข้ากัน ใส่ใน screw cap tube ขนาด 13x100 มม.  
หลอดละ 2 มล. เก็บที่ 4°ซ

3. Bromothymol blue broth (B-broth)

|                              |     |      |
|------------------------------|-----|------|
| <i>Mycoplasma</i> broth base | 21  | กรัม |
| Yeast extract powder         | 1   | กรัม |
| 0.4% bromothymol blue        | 10  | มล.  |
| น้ำกลั่น                     | 900 | มล.  |

autoclave 121°ซ, 15 นาที

|                               |     |     |
|-------------------------------|-----|-----|
| Horse serum                   | 100 | มล. |
| 10% Urea                      | 25  | มล. |
| isovitallex                   | 50  | มล. |
| Penicillin G (1,000,000 U/ml) | 10  | มล. |

ปรับ pH เป็น  $6.0 \pm 0.2$  ด้วย 2 N HCl ใส่ใน screw cap tube ขนาด 13x100 มม. หลอดละ 2 มล. เก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$

4. Standard fluid medium (U10-B)

|   |          |
|---|----------|
| Mycoplasma broth base   | 1.5 กรัม |
| น้ำกลั่น  | 70 มล.   |
| ปรับ pH เป็น 5.5 ด้วย 2 N HCl<br>autoclave $121^{\circ}\text{C}$ , 15 นาที<br>ทิ้งให้เย็นแล้วเติม |          |
| Horse serum   | 20 มล.   |
| 25% Yeast extract   | 10 มล.   |
| 2% L-cysteine HCl   | 0.5 มล.  |
| 10% Urea  | 0.4 มล.  |
| Isovitalex  | 0.5 มล.  |
| 1% phenol red   | 0.1 มล.  |
| Penicillin G (1,000,000 U/ml)   | 1 มล.    |

แบ่งใส่ขวดเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

หมายเหตุ. Horse serum ที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น unheated normal horse serum

5. Phosphate buffer saline pH 7.2

|                           |      |      |
|---------------------------|------|------|
| KCl                       | 2    | กรัม |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$  | 2    | กรัม |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ | 11.5 | กรัม |
| NaCl                      | 8    | กรัม |
| น้ำกลั่น                  | 1000 | มล.  |

ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย 1N HCl

การเตรียม Supplement สำหรับเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. 25% Yeast extract

|                        |      |      |
|------------------------|------|------|
| Baker yeast (Fermipan) | 200  | กรัม |
| น้ำกลั่น               | 1000 | มล.  |

ตุ๋นในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาทีทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave 121°C, 15 นาที แบ่งใส่ขวดเก็บที่ -20°C

## 2. 10% Urea stock solution

|          |     |      |
|----------|-----|------|
| Urea     | 10  | กรัม |
| น้ำกลั่น | 100 | มล.  |

ทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอนเมตร แบ่งใส่ขวดเก็บที่ -20°C



## 3. 4% L-cysteine HCl Solution

|                |     |      |
|----------------|-----|------|
| L-cysteine HCl | 4   | กรัม |
| น้ำกลั่น       | 100 | มล.  |

ทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

## 4. 2% Phenol red solution

|            |     |      |
|------------|-----|------|
| Phenol red | 2   | กรัม |
| น้ำกลั่น   | 100 | มล.  |

ละลายให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 นาที เก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$

ศูนย์วิทยุแพทยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค.

### การหาปริมาณของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว

ปริมาณของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลววัดเป็น Color changing units (CCU)

### วัสดุที่ใช้

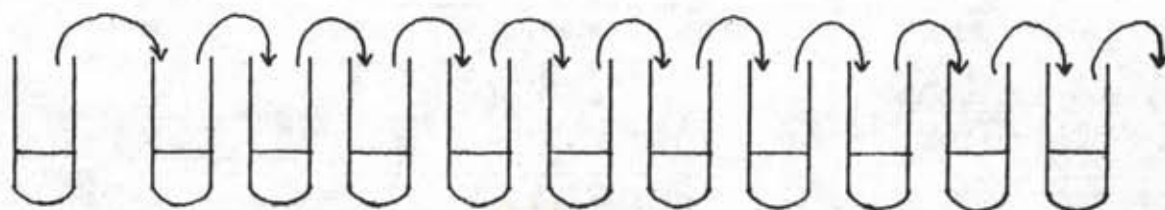
sterile pipette ขนาด 1 มล.  
Broth medium : U9 broth pH 6.0  
sterile test tube ขนาด 13x100 มม.  
Vortex mixer

### วิธีทำ

1. เตรียม U9 broth บรรจุหลอดละ 1.8 มล. จำนวน 10 หลอด, 3 แถว
2. ใส่ inoculum ของเชื้อ *U. urealyticum* ปริมาณ 0.2 มล. ในหลอดแรกของแต่ละแถว ทำให้เจือจาง ten-fold dilution ตามลำดับ ตั้งแต่หลอดที่ 2-10 ทั้ง 3 แถว ดังภาพ

0.2 มล.

0.2 มล.



Stock      -1      -2      -3      -4      -5      -6      -7      -8      -9      -10  
 Ureaplasma <----- 19 broth 1.8 มล. ----->  
 อบที่ 37°C, 18-24 ชม.

3. อ่านผลที่หลอดสุดท้ายที่มีการเปลี่ยนสีจากเหลือง-ส้มอ่อน เช่น
- แถวที่ 1 หลอดสุดท้ายที่เปลี่ยนสีคือหลอดที่  $10^{-8}$   
 แถวที่ 2 หลอดสุดท้ายที่เปลี่ยนสีคือหลอดที่  $10^{-9}$   
 แถวที่ 3 หลอดสุดท้ายที่เปลี่ยนสีคือหลอดที่  $10^{-10}$

4. นำมาคำนวณหาค่า CCU

$$\begin{aligned} \text{The number of CCU} &= \frac{10^8}{3} + \frac{10^9}{3} + \frac{10^{10}}{3} \\ &= 10^8 \frac{(1+1+10)}{3} \\ &= 4 \times 10^8 \end{aligned}$$

การหาค่า MIC ของเชื้อ E.coli ATCC 25922

Escherichia coli 25922 ได้รับมาจาก American Type Culture Collection

วัสดุที่ใช้

Sterile pipette ขนาด 1 มล.  
 Broth medium : B-broth pH 6.0  
 Sterile test tube ขนาด 13x100 มม.  
 Vortex mixer

ยาต้านจุลชีพที่ใช้

Stock solution ความเข้มข้น 1280 ug/ml ของยาดีออกซีไซคลิกลิน อิริซัยโรรมัยซิน, มิโนไซคลิกลิน และ เตตราไซคลิกลิน โดยคำนวณจากสูตร

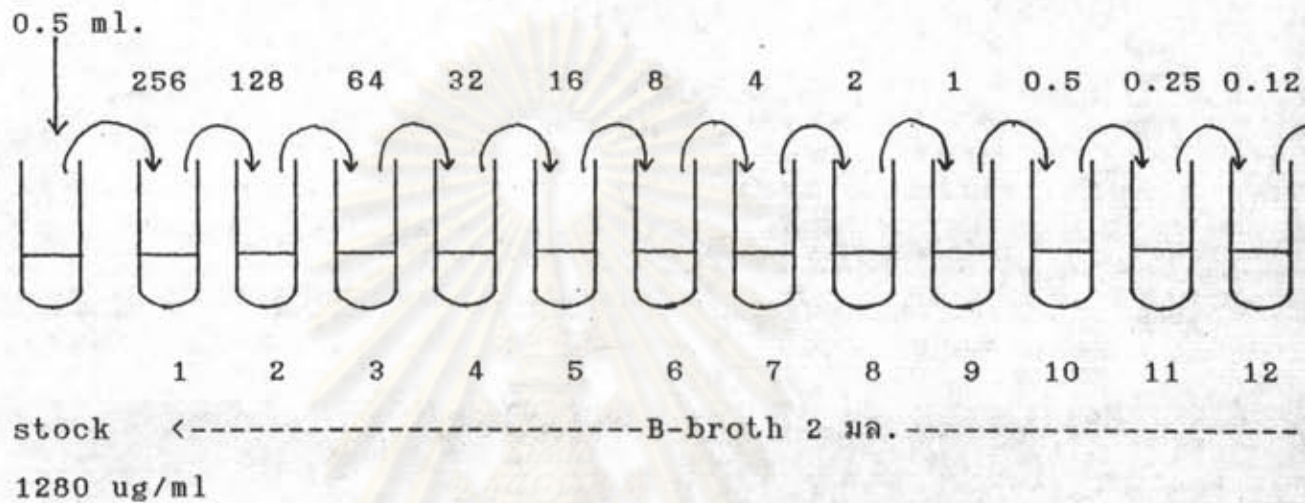
$$\text{น้ำหนักยาแต่ละชนิด (g)} = \frac{1280 \times \text{ปริมาณที่ต้องการ}}{\text{potency ของยานั้น}}$$

Inoculum ของเชื้อ E.coli ATCC 25922

เพาะเชื้อ E.coli ATCC ใน Mueller-Hinton broth วัดปริมาณของเชื้อให้ได้ค่า optical density (OD) 0.05 ที่ 600 นาโนมิเตอร์ (ซึ่งจะเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml บนอาหารแข็ง) เจือจาง 1:100 ใน B-broth เพื่อใช้เป็น inoculum สำหรับทำ MIC

วิธีทำ

1. เตรียม antibiotic solution ความเข้มข้นตั้งแต่ 256-0.125 ug/ml



2. ใส่ inoculum เชื้อ E.coli ATCC 25922 ที่เตรียมไว้ปริมาณ 0.1 มล. ในทุก dilution ของยาต้านจุลชีพและหลอดควบคุมด้วยผสมให้เข้ากัน อบที่ 37°ซ อ่านผล MIC ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

การอ่านผล

อ่านค่า MIC ที่หลอดสุดท้ายซึ่งไม่มีการเจริญของเชื้อ B-broth จะยังคงใสอยู่ ในขณะที่เชื้อเจริญได้ B-broth จะขุ่น

ผลการทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อ E.coli ATCC 25922

| <u>MIC (mg/ml)</u> | <u>E.coli ATCC 25922</u> |
|--------------------|--------------------------|
| Doxycycline        | 0.5                      |
| Erythromycin       | 256                      |
| Minocycline        | 4                        |
| Tetracycline       | 2                        |

ศูนย์วิจัยทางการแพทย์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวประภาวดี บุญเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2497 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง เมื่อปี พ.ศ. 2520 และเข้ารับราชการที่กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 จนถึงปัจจุบัน



ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย