Srinagarind Hosp Med J 1991 ; 6(2) : 101-106

# การสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนของเชื้อคริปโตคอคคัสนีโอฟอร์แมนส์ในกระต่าย

ศรีวิไล วโรภาสตระกูล*
กาญจนา เลิศมีมงคลชัย*
นเรศ วโรภาสตระกูล**
อรุณรัฐ ร่มพฤกษ์*

*ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**A Study on Inmune Response to Cryptococcus Neoformans Antigens in Rabbits**

Srivilai Varopastrakul, Ganjana Lertmemongkolchai,
Nareas Waropastrakul, Arunrat Romphruk

**A study on immune response to *Cryptococcus neoformans* antigens was done in rabbits. Three different doses of encapsulated *C. neoformans* antigens, 1.5 X $10^7$, 1.5 X $10^8$ and 1.5 X $10^9$ cells/milliliter respectively, were injected intravenously via ear vein. Results showed that the concentration of 1.5 X $10^8$ cells/milliliter stimulated high agglutination titers of antibody i.e., 1024 in one rabbit and 32768 in the other. For comparison, the titer of antiserum obtained from rabbits immunized with 1.5 X $10^7$ cells/milliliter did not exceed 64, while the dose of 1.5 X $10^9$ cells/milliliter killed rabbits. Results suggested that a high quantity of anti-*C. neoformans* antiserum could be prepared in rabbits. This antiserum would be an important reagent in the development of the serological test kit for Cryptococcal diagnosis.**

**KEY WORD :** *Cryptococcus neoformans,* Antibody response.

## บทคัดย่อ

ในการศึกษาการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ในกระต่าย พบว่าเมื่อใช้เชื้อ *C. neoformans* สายพันธุ์ที่มีแคปซูลบางที่ความเข้มข้น $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ฉีดเข้าหลอดเลือดดำจะให้ผลการตอบสนองของแอนติบอดีจำเพาะ มีแอกกลูติเนชั่นไตเตอร์สูงกว่าการกระตุ้นด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้น $1.5\times10^9$ และ $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร คือกระต่ายที่ฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์แอนติเจน $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ตัวแรกจะให้ไตเตอร์ของแอนติบอดีจำเพาะที่ 1024 และอีกตัวหนึ่งให้ไตเตอร์ที่ 32768 ในขณะที่เมื่อใช้เซลล์แอนติเจนดังกล่าวที่ความเข้มข้น $1.5\times10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร กระต่ายตาย และเมื่อใช้เซลล์แอนติเจนที่ความเข้มข้น $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร กระต่ายได้ให้ไตเตอร์ของแอนติบอดีจำเพาะได้ไม่เกิน 64 ผลการศึกษาครั้งนี้อาจใช้

**เป็นแนวทางในการเตรียมแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *C. neoformans* ในปริมาณมากพอที่จะนำไปพัฒนาวิธีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อ Cryptococcus**

**คำรหัส :** *คริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์, การตอบสนองของแอนติบอดี*

## บทนำ

*Cryptococcus neoformans* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค Cryptococcosis ผู้ป่วยมักได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยทางระบบทางเดินหายใจเป็นส่วนใหญ่ ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องอาจลุกลามกระจายไปยังระบบประสาทส่วนกลาง ก่อให้เกิดอาการของเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยตายได้[1,2]

การตรวจวินิจฉัยทางเวชศาสตร์ชันสูตรสามารถตรวจหาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยตรง หรือการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นตอบสนองต่อตัวเชื้อ อย่างไรก็ตามในทางการแพทย์การตรวจหาตัวเชื้อสาเหตุจะช่วยการวินิจฉัยโรคได้แม่นยำขึ้น แต่การเพาะเชื้อโดยตรงต้องอาศัยเวลานาน ในทาง serology ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* ได้หลายวิธี เช่น immunodiffusion, immunofluo rescence และ latex agglutination เป็นต้น[3]

ในการพัฒนาวิธีทดสอบดังกล่าวต้องอาศัยแอนติบอดีจำเพาะที่มีคุณภาพ และปริมาณมากพอในการเตรียมน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป ซึ่งแอนติซีรัมดังกล่าวมีราคาแพง ถ้าสามารถเตรียมได้เองจะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย แต่ในการเตรียมแอนติบอดีต่อเชื้อดังกล่าวยังไม่มีผู้รายงานรูปแบบการตอบสนองในสัตว์ทดลอง ดังนั้นในการศึกษานี้มีความประสงค์จะศึกษาถึงรูปแบบการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อเชื้อ *C. neoformans* ในกระต่าย เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมแอนติบอดีต่อเชื้อดังกล่าวในปริมาณที่มากพอที่จะนำมาใช้พัฒนาวิธีทดสอบเพื่อวินิจฉัยโรค Cryptococcosis ต่อไป

## วัสดุและวิธีการ

### 1. การเตรียม *Cryptococcus neoformans* antigen

เพาะเลี้ยงเชื้อ *C. neoformans* สายพันธุ์ที่มีแคปซูลบางซึ่งได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ใน dextrose peptone yeast broth ที่ 37° ซ. บน shaking water-bath นาน 48 ชั่วโมง ฆ่าทำลายเชื้อด้วยฟอร์มาลินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นแยกแล้ว ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำเกลือที่มีฟอร์มาลิน 0.5% 3 ครั้ง เตรียมให้เป็น 25% เซลล์ ในน้ำเกลือที่มีฟอร์มาลิน 0.5% เก็บเป็น stock yeast cells antigen ที่ 4° ซ. จนกว่าจะใช้

เมื่อต้องการใช้ให้เตรียมนับเซลล์ให้ได้จำนวนตามต้องการใน hemocytometer เพื่อใช้เป็นแอนติเจนกระตุ้นกระต่าย โดยเตรียมเป็นความเข้มข้นเป็น 3 ชนิด คือ ที่ $1.5\times10^9$, $1.5\times10^8$ และ $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร

### 2. การฉีดกระตุ้นกระต่าย

ใช้วิธีการของ Neill JM *et al* (4) โดยใช้กระต่ายขาวตาแดงจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อายุ 12–16 เดือน เพศเมีย จำนวน 7 ตัว โดยแบ่งกระต่ายเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ใช้กระต่าย 2 ตัว ฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์แอนติเจน ความเข้มข้น $1.5\times10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ใช้กระต่าย 2 ตัว ฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์แอนติเจน ความเข้มข้น $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ใช้กระต่าย 3 ตัว ฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์แอนติเจน ความเข้มข้น $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร

เจาะเลือดกระต่ายทุกตัวก่อนฉีดเซลล์แอนติเจนเป็น preimmune serum แล้วฉีดแอนติเจนเข้าหลอดเลือดดำที่บริเวณใบหู โดยฉีดกระตุ้นติดต่อกัน 13 วัน เจาะเลือดทดสอบหาระดับแอนติบอดีทุก ๆ 7 วัน ภายหลังวันที่ 21 ถ้าการตอบสนองของแอนติบอดีมีไตเตอร์น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 จะฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยแอนติเจนความเข้มข้นเดิม แล้วตรวจระดับแอนติบอดีต่อไปทุก ๆ 7 วัน จนถึงวันที่ 84 จึงหยุดการทดลอง

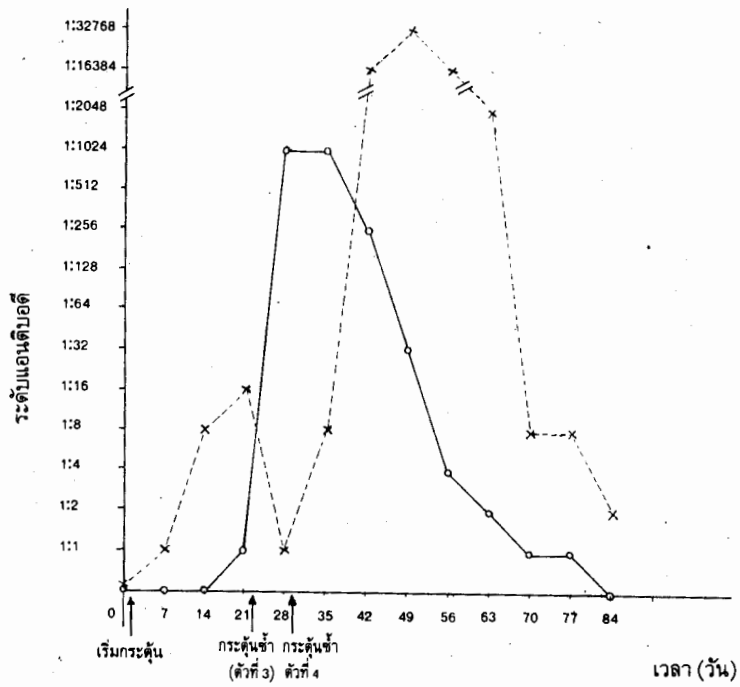
### 3. วิธีทดสอบหาระดับแอนติบอดี

ตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี direct agglutination (3) โดยใช้ 50 ไมโครลิตร ของเชื้อ *C. neoformans* ที่มีความเข้มข้น $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ 50 ไมโครลิตร ของซีรัมทดสอบที่เจือจางเป็น serial dilution อบทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2–3 ชั่วโมง ดูปฏิกิริยา agglutination สำหรับการควบคุมผลบวกนั้นใช้ซีรัมผู้ป่วย Cryptococcosis ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ที่มีไตเตอร์ของแอนติบอดีเท่ากับ 8 ตลอดการศึกษา

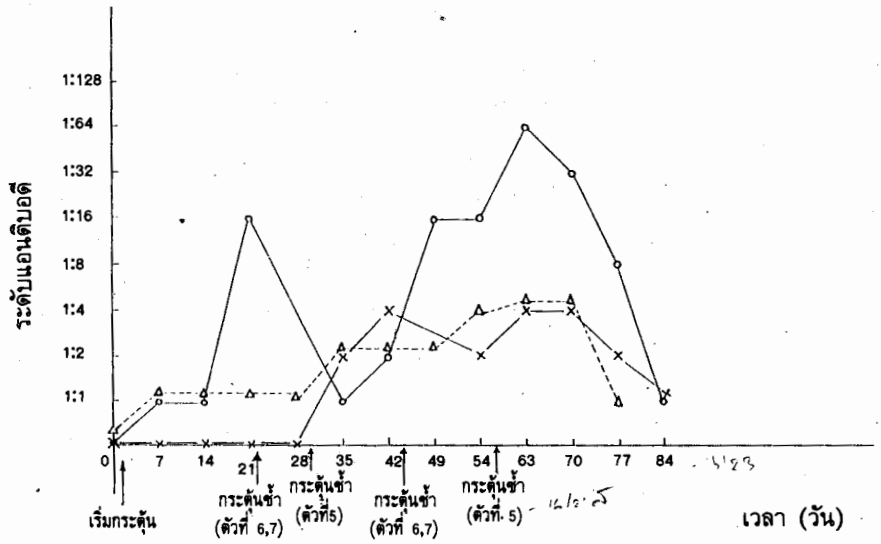
**ตารางที่ 1 ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของกระต่ายกลุ่มที่ 2 และ 3 ที่กระตุ้นด้วยเซลล์แอนติเจนของเชื้อ *C. neoformans* จำนวน $1.5\times10^8$ และ $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ**

| วันที่เจาะเลือดภายหลังฉีดกระตุ้นครั้งแรก | ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ของกระต่าย | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | กลุ่มที่ 2 | | กลุ่มที่ 3 | | |
| | ตัวที่ 3 | ตัวที่ 4 | ตัวที่ 5 | ตัวที่ 6 | ตัวที่ 7 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 14 | 0 | 8 | 1 | 0 | 1 |
| 21 | 1* | 16 | 16 | 0* | 1* |
| 28 | 1024 | 1* | –* | 0 | 1 |
| 35 | 1024 | 8 | 1 | 2 | 2 |
| 42 | 256 | 16384 | 2 | 4** | 2** |
| 49 | 32 | 32768 | 16 | – | 2 |
| 56 | 4 | 16384 | 16** | 2 | 4 |
| 63 | 2 | 2048 | 64 | 4 | 4 |
| 70 | 1 | 8 | 32 | 4 | 4 |
| 77 | 1 | 8 | 8 | 2 | 1 |
| 84 | 0 | 2 | 1 | 1 | – |

**หมายเหตุ** *0 = ไม่มี agglutination* ** = กระตุ้นซ้ำเป็นครั้งที่ 2*
*– = ไม่ได้ทดสอบ* *** = กระตุ้นซ้ำเป็นครั้งที่ 3*




**รูปที่ 1 แสดงระดับแอนติบอดีของกระต่ายที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ *C. neoformans* ($1.5 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร) ในกลุ่มที่ 2 (O----O กระต่ายตัวที่ 3, และ ×----× กระต่ายตัวที่ 4)**




**รูปที่ 2 แสดงระดับแอนติบอดีของกระต่ายที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อ *C. neoformans* ($1.5 \times 10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร) ในกลุ่มที่ 3 (O----O กระต่ายตัวที่ 5, ×----× กระต่าย ตัวที่ 6 และ △----△ กระต่ายตัวที่ 7)**

## ผลการศึกษา

กลุ่มที่ 1 ใช้แอนติเจนความเข้มข้น $1.5\times10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร กระตุ้นกระต่าย กระต่ายตัวที่ 1 ตายในวันที่ 4 และกระต่ายตัวที่ 2 เมื่อฉีดแอนติเจนกระตุ้นได้ 2 ครั้งเกิดผื่นแดงที่บริเวณใบหูทั้งสองข้างจึงหยุดการกระตุ้นแล้วเริ่มฉีดแอนติเจนเดิม ในวันที่ 25 กระต่ายตายในวันที่ 27 ได้ทดสอบหาระดับแอนติบอดีตอบสนองทั้ง preimmune serum และ immune serum ไม่พบไตเตอร์ของแอนติบอดี

ในกลุ่มที่ 2 ใช้แอนติเจนความเข้มข้น $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ฉีดกระตุ้นเข้ากระต่ายตัวที่ 3 และตัวที่ 4 พบว่ากระต่ายมีการตอบสนองดีและได้แอนติบอดีไตเตอร์สูง (ตารางที่ 1) โดยกระต่ายตัวที่ 3 ให้ไตเตอร์สูงสุด 1024 ภายหลังเริ่มฉีดกระตุ้นซ้ำ ในวันที่ 28 และ 35 จากนั้นระดับแอนติบอดีจะลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 256, 32 และ 4 ในวันที่ 42, 49 และ 56 ตามลำดับ และในวันที่ 84 ไม่พบระดับแอนติบอดีไตเตอร์ ในทำนองเดียวกันกระต่ายตัวที่ 4 จะให้รูปแบบการตอบสนองคล้ายคลึงกับตัวที่ 3 คือภายหลังการฉีดกระตุ้นซ้ำ ระดับแอนติบอดีมีไตเตอร์สูงขึ้นจาก 1 เป็น 8 ในวันที่ 35 และ ไตเตอร์ของแอนติบอดีจะขึ้นสูงสุดในวันที่ 49 เท่ากับ 32768 จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีเท่ากับ 2 ในวันที่ 84 ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1

สำหรับกลุ่มที่ 3 เมื่อใช้แอนติเจนมีความเข้มข้น $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร ฉีดกระตุ้นกระต่ายตัวที่ 5,6 และ 7 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2 ในกลุ่มนี้หลังจากกระตุ้นครั้งแรกแล้วกระตุ้นซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยฉีดกระตุ้นซ้ำเป็นครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ในกระต่ายตัวที่ 6 และตัวที่ 7 ในวันที่ 22 และ วันที่ 43 ตามลำดับ และในกระต่ายตัวที่ 5 ในวันที่ 29 และวันที่ 57 พบว่ารูปแบบการตอบสนองของแอนติบอดีต่อเชื้อ *C. neoformans* คล้ายคลึงกัน โดยกระต่ายตัวที่ 5 จะให้ผลการตอบสนองของแอนติบอดีดีกว่ากระต่ายตัวที่ 6 และตัวที่ 7 แต่อย่างไรก็ตามกระต่ายตัวที่ 5 ได้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ขึ้นสูงสุดเท่ากับ 64 ในวันที่ 63 และลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือไตเตอร์เท่ากับ 1 ในวันที่ 84 ในขณะที่กระต่ายตัวที่ 6 และตัวที่ 7 มีระดับแอนติบอดีมีไตเตอร์สูงสุดเท่ากับ 4 ภายหลังกระตุ้นซ้ำถึง 2 ครั้ง

## วิจารณ์ผลและสรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นจำนวนเชื้อความเข้มข้น $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จะให้ผลการสร้างแอนติบอดีในกระต่ายได้ดีกว่าแอนติเจนความเข้มข้นที่ $1.5\times10^9$ และ $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) ซึ่งได้ไตเตอร์ของแอนติบอดีหลังการกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 2 เท่ากับ 1024 ในกระต่ายตัวที่ 3 และได้ไตเตอร์ที่ 32768 ในกระต่ายตัวที่ 4 อย่างไรก็ตามยังมีความแตกต่างของระดับแอนติบอดีที่สร้างระหว่างกระต่ายตัวที่ 3 และตัวที่ 4 เมื่อใช้แอนติเจนชนิดและความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นผลการตอบสนองของแอนติบอดีต่อเชื้อ *C. neoformans* ควรคำนึงถึงปัจจัยทางสรีรวิทยาของกระต่ายด้วย และเมื่อติดตามการตอบสนองของกระต่ายทั้งสองในการสร้างแอนติบอดีพบว่าระดับแอนติบอดีจะลดลงอย่างรวดเร็ว ได้แก่ กระต่ายที่ 3 จะลดลงจากไตเตอร์ 1024 ในวันที่ 35 เป็น 256 ในวันที่ 42 และเป็น 32 ในวันที่ 49 และไม่ให้ผลบวก agglutination กับ

ตัวเชื้อ *C. neoformans* อีก ในวันที่ 84 และเช่นเดียวกันกับกระต่ายตัวที่ 4 จะพบว่ามีการสร้างแอนติบอดีขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน จากไตเตอร์แอนติบอดี 32768 ในวันที่ 49 เป็นไตเตอร์ 2048 ในวันที่ 63 และลดลงเหลือแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 2 ในวันที่ 84 ซึ่งปรากฏการณ์การสร้างแอนติบอดีของกระต่ายต่อเชื้อ *C. neoformans* จะขึ้นและลดลงได้เร็วกว่าการกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยเชื้อแบคทีเรีย (5) ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดของเซลล์แอนติเจน ซึ่งเชื้อ *C. neoformans* มีแคปซูลซึ่งเป็นสารพวก polysaccharides ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนได้ต่ำกว่าสารโปรตีน (3) ที่ห่อหุ้มเชื้ออยู่

เมื่อใช้จำนวนแอนติเจนความเข้มข้น $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร ฉีดในกระต่ายตัวที่ 5, ตัวที่ 6 และตัวที่ 7 พบว่ากระต่ายแต่ละตัวจะให้รูปแบบการตอบสนองที่คล้ายคลึงกัน จะมีแตกต่างกันบ้างโดยเฉพาะกระต่ายตัวที่ 6 จะไม่สร้างแอนติบอดีตอบสนอง เมื่อฉีดกระตุ้นครั้งแรก แต่เมื่อฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 พบว่ามีสร้างแอนติบอดีได้ไตเตอร์ไม่เกิน 4 ซึ่งใกล้เคียงกับกระต่ายตัวที่ 7 (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2) สำหรับกระต่ายตัวที่ 5 จะให้การตอบสนองในการสร้างแอนติบอดีได้ดีที่สุดในกลุ่มนี้จะเห็นว่าเมื่อฉีดกระตุ้นในครั้งที่ 2 และ 3 จะให้ระดับแอนติบอดีตอบสนองได้ไตเตอร์สูงเท่ากับ 64 ในวันที่ 63 และลดลงอย่างเร็วเหลือไตเตอร์เท่ากับ 1 ในวันที่ 84 เท่ากับกระต่ายตัวที่ 6 แต่อย่างไรก็ตามการสร้างแอนติบอดีของกระต่ายที่ตอบสนองต่อแอนติเจนของเชื้อ $1.5\times10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร ยังให้ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ได้น้อยกว่าและเกิดช้ากว่าที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนความเข้มข้น $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร (รูปที่ 1, 2) Neill JM *et al* (1950) พบว่าจำนวนความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้กระตุ้นมีผลต่อการสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *C. neoformans* (4) ดังนั้นความเข้มข้น $1.5\times10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นกระต่าย และควรใช้กระต่ายอย่างน้อย 3 ตัวในการกระตุ้นแต่ละครั้ง

ในการศึกษานี้แม้ว่าจะได้รูปแบบการตอบสนองของกระต่ายในการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *C. neoformans* เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเตรียมแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงและปริมาณมาก สำหรับใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ Cryptococcosis ก็ตาม ก็ควรจะมีการศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดอื่นที่ก่อโรคคล้ายคลึงกันด้วย เพื่อยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีในการนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์ชันสูตรอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนประเภททั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

## เอกสารอ้างอิง

1. Beneke E S, Rogers A L. Medical Mycology Manual with human mycoses monograph. Fourth Edition, Minnesota : Burgess Publishing Company, 1980 : 134.
2. Howard D H, Howard L F. Fungi Pathogenic for humans and animals. Part B. Pathogenicity and Detection. New York Marcel Dekker. Inc, 1983 : 163-169.
3. Palmer DF, Kaufman L, Kaplan W, Cavallaro J. Serodiagnosis of mycotic diseases. Illinois : Charles C. Thomas Publisher, 1977 : 82-103.
4. Neill J M, Abrahams I, Kapros C E. A comparison of the immunogenicity of weakly encapsulated and of strongly encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans. (Torula histolytica).* J Bacteriol 1950 59 ; 263-75.
5. อรุณรัฐ ร่มพฤกษ์, ศรีวิไล วโรภาสตระกูล, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์, กาญจนา เลิศมีมงคลชัย, วิภาวดี แมนมนตรี, สุนทร กัณหาสุระ. การทดลองกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูถีบจักรด้วยแอนติเจนชนิดสกัดและเซลล์ทั้งตัวของเชื้อป์สูโดโมนาสป์สูโดมาลิโอ. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2533; 2(2) : 36-41.