การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas caviae*

ปริญญานิพนธ์

ของ

หทัยทิพย์ สุขสดใส

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2551

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas caviae*

ปริญญานิพนธ์

ของ

หทัยทิพย์ สุขสดใส

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas caviae*

บทคัดย่อ

ของ

หทัยทิพย์ สุขสดใส

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2551

หทัยทิพย์ สุขสดใส.(2551). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ Aeromonas caviae.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม (ชีววิทยา) กรุงเทพ ฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์, ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล

ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* 5 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วย AC1, AC2, AC3, AC4 และ AC5 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ในการปลูกภูมิคุ้มกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มี 24 โคลน สามารถแบ่งออกเป็น 12 กลุ่มตามความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 – 5 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. caviae* บางไอโซเลตเท่านั้นได้แก่ กลุ่มที่ 1 และ 2 จำเพาะต่อ AC1 กลุ่ม 3 และ 4 จำเพาะต่อ AC2, AC5 และ AC7 กลุ่มที่ 5 จำเพาะต่อ AC4 สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 – 8 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. caviae* บางไอโซเลตเช่นกัน แต่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *Plesiomonas shigelloides* บางไอโซเลตด้วย สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 – 12 จับกับ *Aeromonas* spp. ทุกไอโซเลตที่ใช้ตรวจสอบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 11 และ 12 สามารถจับกับ *Aeromonas* ทุกไอโซเลต เช่นกัน แต่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Plesiomonas shigelloides* และ *Vibrio* บางชนิดด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 – 8 จับกับ lipopolysaccharide ขนาดต่างๆ กัน ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 – 12 จับกับโปรตีนขนาดเล็ก (20 – 30 kDa) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 – 7 เท่านั้นที่สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อได้โดยวิธี immunohistochemistry ความไวในการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการตรวจเชื้อ *A. caviae* โดยวิธี dot blotting อยู่ในช่วง 10^6 – 10^9 CFU/ml แต่ถ้าตัวอย่างที่มีการเพิ่มจำนวนในอาหาร TSB ก่อนนำมาตรวจ 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มความไวเป็น 1 CFU/ml ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จึงสามารถใช้ตรวจสอบและจำแนกไอโซเลตต่างๆ ของ *A. caviae* ได้โดยตรง และยังสามารถใช้ประมาณปริมาณการปนเปื้อน *Aeromonas* spp. ส่วนใหญ่ในตัวอย่างได้โดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อออกจากตัวอย่าง

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO *Aeromonas caviae*

AN ABSTRACT

BY

HATHAITIP SUKSODSAI

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science degree of Biology

at Srinakharinwirot University

May 2008

Hathaitip Suksodsai. (2008). *Production of monoclonal antibodies specific to Aeromonas caviae.* Master thesis,M.Sc. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst. Prof. Dr. Siwaporn Longyant, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul

Twenty four monoclonal antibodies (MAbs) against five isolates of *Aeromonas caviae* (AC1, AC2, AC3, AC4 and AC5) were generated using whole cell of bacteria for immunization. They were divided into 12 groups according to their specificities by dot blotting. The first five groups of MAbs were isolate specific without cross reaction to other *Aeromonas* spp. The first and the second groups of MAbs were specific to one isolate of *A. caviae* (AC1). The third and the fourth groups of MAbs were specific to 3 isolates of *A. caviae* (AC2, AC5, and AC7). The fifth group of MAbs was specific to one isolate of *A. caviae* (AC4). MAbs in group six, seven and eight were also specific to some isolates of *A. caviae* but demonstrated cross reactivity to some isolates of *A. hydrophila*, *A. sobria* and *Plesiomonas shigelloides*. MAbs in groups 9 – 12 recognized all *Aeromonas* spp. tested; however, MAbs in group 11 and 12 also exhibited cross reactivity to some isolates of *P. shigelloides* and some *Vibrio* spp. as well. The antigens recognized by MAbs in group 2 – 8 were lipopolysaccharide with various sizes, while MAb in group 9 – 12 recognized small molecular weight (20 – 30 kDa) antigens. Only MAbs in group 1 – 7 can detect *A. caviae* infection in tissue by immunohistochemistry. The sensitivity of detection of these MAbs determined by dot blotting was range from 10^6 – 10^9 CFU/ml. However, the detection sensitivity would increase to 1 CFU/ml after pre-enrichment in tryptic soy broth for 6 hr. Therefore, these MAbs can be used for direct detection and differentiation of *A. caviae* in sample without bacterial isolation.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas caviae*

ของ

หทัยทิพย์ สุขสดใส

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ดร. วรรนิภา เพี้ยนภักตร์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ แก่ข้าพเจ้า รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ดร. วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำ แก้ไขปรับปรุงปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสมบัติ รักประทานพร ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี รวมถึงพี่ๆ และน้องๆ ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ทุกคน ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอน้อมรำลึกถึงคุณ บิดา และมารดาของข้าพเจ้า ที่ดูแล ช่วยเหลือ และให้กำลังใจเสมอมา ขอขอบคุณสัตว์ทดลองทุกชีวิตในการทำวิจัยของข้าพเจ้า ขอนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง และปลานิลทุกตัว ที่ได้สละชีวิตในการทำวิจัยของข้าพเจ้า

หทัยทิพย์ สุขสดใส

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 **บทนำ**..... 1

ภูมิหลัง..... 1

ความมุ่งหมายของการวิจัย..... 3

ความสำคัญของการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

สมมติฐานการวิจัย..... 4

2 **เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**..... 5

3 **วิธีดำเนินการวิจัย**..... 18

อุปกรณ์และสารเคมี..... 18

วิธีดำเนินการทดลอง..... 24

การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว..... 24

การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา..... 25

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา..... 27

การตรวจสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 32

4 **ผลการทดลอง**..... 35

5 **สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**..... 53

บรรณานุกรม..... 57

ภาคผนวก..... 65

ประวัติย่อผู้วิจัย..... 84

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. caviae*..... 6

2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ……..…. 16

3 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน
และทดสอบความจำเพาะ..... 21

4 ผลทดสอบทางชีวเคมีระหว่าง *A. caviae*, *A. hydrophila* และ *A. sobria*..... 36

5 ค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทป
ของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ..... 49

6 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ที่จำเพาะต่อ *A. caviae*..... 51

7 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel..... 72

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization…… 13

2 การสังเคราะห์ DNA โดยวิถี de novo และ วิถี salvage และการยับยั้ง
การสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิถี de novo…..... 15

3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 26

4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี dot blotting……..…… 28

5 การตรวจสอบลักษณะโมโนโคลนอลแอนติบอดี
โดยวิธี Western blotting……..…… 29

6 วิธีการทดสอบ immunohistochemistry……..... 31

7 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..... 34

8 ลักษณะโคโลนีของ *A. caviae* และแสดงการติดสีย้อมแกรม…….. 35

9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว
ด้วยวิธี Western blotting..... 37

10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting..... 41

11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ด้วยวิธี Western blotting……..…… 43

12 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2 และ 6
ด้วยวิธี immunohistochemistry..... 44

13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3, 4 และ 7
ด้วยวิธี immunohistochemistry……..… 45

14 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5
ด้วยวิธี immunohistochemistry……..… 46

15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ด้วยวิธี dot blotting……..…….... 47

16 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ กับตัวอย่างธรรมชาติ
ด้วยวิธี dot blotting..... 48

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอาชีพที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกร และประเทศได้ปีละมากๆ โดยจะได้ผลผลิตมากยิ่งๆ ขึ้น ถ้าไม่ประสบกับปัญหาโรคระบาด ในปัจจุบันนี้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ ให้ความสำคัญกับปัญหาโรคระบาดเป็นอย่างมาก แต่เกษตรกรส่วนใหญ่ยังขาดความรู้ความชำนาญในด้านการรักษาและป้องกันโรค การตรวจพบเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถหาทางป้องกันการเกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำ และรักษาได้ทันท่วงที ยังผลให้ช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและสาธารณสุขลงอย่างมาก (พาลาภ สิงหเสนี และคณะ. 2530: จ) เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานการตรวจพบจากที่ต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งในการก่อโรคระบาดในสัตว์น้ำ ได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* สมาชิกของ *Aeromonas* สามารถก่อให้เกิดได้หลายโรคในมนุษย์ เช่น โรคโลหิตเป็นพิษ (septicemia) การติดเชื้อทางบาดแผล หรือก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โดยทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นโรคท้องร่วง (Janda. 1991: 397) อีกทั้งยังอาจก่อให้เกิดโรคกับสัตว์น้ำหลายชนิดสำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* เช่น *A. hydrophila* และ *A. sobria* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำรุนแรงมากกว่าสปีชีส์อื่นๆ เช่น ทำให้ปลาที่ติดเชื้อมีเลือดออกตามตัว และมีลักษณะเน่าเปื่อยตามผิวหนัง เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Cipriano; et al. 2001: unpaged) เชื้อ *Aeromonas* จะพบอยู่มากในช่วงอากาศอบอุ่นมากกว่าอากาศเย็น จึงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *Aeromonas* ทางบาดแผลของผู้ที่ใช้น้ำหรือเล่นน้ำในช่วงอากาศอบอุ่น (Ardi; & Olson. 2004: 11)

เชื้อ *A. caviae* เป็นแบคทีเรียที่เดิมจัดอยู่ในตระกูล Vibrionaceae (Popoff. 1984: 545) ต่อมาเปลี่ยนเป็น Aeromonadaceae (Colwell; et al. 1986: 473) มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพล่าแฟลกเจลลา (polar flagella) สามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามที่เปียกชื้นใน ดิน และในแหล่งน้ำตามธรรมชาติทั่วไปที่เป็นแหล่งน้ำจืด และน้ำกร่อย รวมถึงในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์น้ำบางชนิดอาจพบว่ามีเชื้อนี้อยู่ตามระบบทางเดินอาหาร และตามผิวหนังโดยไม่ทำให้เกิดโรค ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เช่น พวกกบ (Pearson; et al. 2000: 186) ตัวอ่อนปลาเทอร์บอต (Ringø; & Vadstein. 1998: 227) ปลาเทราท์ (Korkoca; & Boynukara. 2003: 1173) และปลาที่เพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำจืด (Sugita; et al. 1996: 196) *A. caviae* ก่อให้เกิดสภาวะทางโรคได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อ *A. hydrophila* และ *A. sobria* (Altwegg. 1985: 228) แต่จะพบว่า *A. caviae* นี้จะก่อให้เกิดโรคระบบ

ทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis) ของมนุษย์ โดยทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นโรคท้องร่วง (diarrheal disease) (Elcuaz; et al. 1995: 5; Deodhar; et al. 1991: 853; Alavandi; & Ananthan. 2003: 233; Vila; et al. 2003: 552) ซึ่งมักพบในเด็กเล็ก (Namdari; & Bottone. 1990: 837) โดยประมาณสองในสามของเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระของคนเป็นโรคท้องร่วงมักจะพบเชื้อ *A. caviae* (Altwegg. 1985: 228) ได้มีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงในประเทศต่างๆ ได้แก่ บาเซโลน่า สเปน (Vila; et al. 2003: 552) ฟิลิปปินส์ (Leono; et al. 1992: 49) อินเดีย (Alavandi; & Ananthan. 2003: 233) ฮ่องกง (Duthie; et al. 1995: 241) และคิวบา (Escarpulli; et al. 2002: 11) ผู้ป่วยจะมีอาการถ่ายเป็นน้ำ ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ มีไข้ และปวดท้อง (Namdari; & Bottone. 1990: 837) บางกรณีพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้มีเยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) ร่วมด้วย (Elcuaz; et al. 1995: 5) โรคท้องร่วงนี้อาจเกิดจากการรับประทานอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ ทำให้ติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ (Vila; et al. 2003: 554) ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอเช่น เด็กทารกที่ไม่ได้ทานน้ำนมแม่ทำให้ไม่มีภูมิต้านทาน ก็มีโอกาสที่จะติดเชื้อ *A. caviae* ได้ด้วยเช่นกัน (Namdari; & Bottone. 1990: 837) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. caviae* ที่ติดมากับคอนแทคเลนส์ สามารถทำให้เกิดโรคแก้วตาอักเสบ (keratitis) ได้เช่นกัน โดยอาจเกิดจากการไม่รักษาความสะอาดของคอนแทคเลนส์ ทำให้มีโอกาสเสี่ยงที่จะติดเชื้อ *A. caviae* ได้ (Pinna; et al. 2004: 348 - 351)

ในอดีตได้มีการคิดค้นพัฒนาวิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *A. caviae* หลายวิธีทั้งวิธีแบบดั้งเดิม (conventional method) โดยการทดสอบทางชีวเคมี (Elcuaz; et al. 1995: 5; Pinna; et al. 2004: 349) ซึ่งการตรวจโดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยานี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้ระยะเวลาในการตรวจนาน ทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปอย่างล่าช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ จึงได้มีผู้พัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธีทางโมเลกุล (molecular method) โดยการใช้เทคนิค PCR (Khan; & Cerniglia. 1997: 235) ซึ่งมีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นาน แต่การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางโมเลกุลนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง

สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันสำหรับใช้ตรวจเชื้อ *A. caviae* โดยจะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies) ต่อเชื้อ *A. caviae* ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างจากเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ๆ เดียว จึงมีความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจนที่ใช้เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงโดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อแอนติเจนชนิดนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดเดียวกันนี้ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์

แบคทีเรียชนิดนี้ โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเป็นประโยชน์อย่างมากเนื่องจากเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันมีความไวและความแม่นยำสูง อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่สะดวกง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียต่าง ๆ ในสกุล *Aeromonas* นั้น ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* ที่ก่อโรคในปลา พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* ไอโซเลต 1234 โดยสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. hydrophila* ได้ (Prahkarnkaeo; et al. 2005) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* เลย ดังนั้นจึงคาดว่าการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. caviae* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ และการติดเชื้อชนิดนี้ในคน น่าจะเป็นประโยชน์ และสามารถประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความไวเพิ่มขึ้นและความสะดวกในการใช้ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจำแนก *A. caviae* จาก *Aeromonas* spp. ต่างๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ
2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเบื้องต้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. caviae*

ความสำคัญของการวิจัย

เพื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. caviae* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ และการติดเชื้อชนิดนี้ในคน ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้เพื่อนำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความไวเพิ่มขึ้นและความสะดวกในการใช้ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมแบคทีเรีย และแอนติเจนสำหรับใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
2. เหนี่ยวนำการติดเชื้อ *A. caviae* โดยการฉีด *A. caviae* ในปลานิลสำหรับใช้ทำการทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry
3. ผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และ คัดเลือกจากปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ

4. ตรวจสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยวิธี indirect ELISA และ sandwich ELISA

สมมติฐานในการวิจัย

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. caviae* ในตำแหน่งของอิพิโทปต่างๆ กัน ทำให้สามารถจำแนก *A. caviae* ออกจาก *Aeromonas* spp. ต่างๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ภูมิหลัง *Aeromonas caviae*

Aeromonas caviae เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล Aeromonadaceae (Colwell; et al. 1986: 473) อาศัยอยู่อย่างอิสระในน้ำจืด หรือน้ำกร่อย รวมถึงในพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บางครั้งพบในดิน อาหาร สัตว์ แมลง และคน ดังที่ได้มีรายงานตรวจพบเชื้อนี้ในระบบทางเดินอาหารและตามผิวหนังของสัตว์ต่างๆ เช่น พวกสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Pearson; et al. 2000: 186) พวกแมลง (Nayduch; et al. 2005: 74) และปลาที่เพาะเลี้ยงไว้ในแหล่งน้ำจืด (Sugita; et al. 1996: 196) รวมถึงอุจจาระของผู้ที่เป็นโรคท้องร่วงด้วย (Altwegg. 1985: 228) *A. caviae* ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในคน โดยทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นโรคท้องร่วง ซึ่ง *A. caviae* จัดเป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสติดเชื้อในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันอ่อนแอ *A. caviae* พบอยู่มากในช่วงอากาศอุ่นมากกว่าอากาศเย็น ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อชนิดนี้ทางบาดแผลของผู้ใช้น้ำหรือเล่นน้ำในช่วงอากาศอบอุ่น (Ardi; & Olson. 2004: 11) สำหรับเชื้อ *A. caviae* นั้นพบว่าก่อให้เกิดสภาวะทางโรคในสัตว์น้ำได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น *A. hydrophila* และ *A. sobria* (Cipriano; et al. 2001: unpaged)

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของ *Aeromonas caviae*

แบคทีเรีย *A. caviae* มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดความยาวประมาณ 1-4 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพล่าแฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและสภาพที่ไม่มีอากาศ (facultatively anaerobic bacteria) (Popoff. 1984: 545) มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ ลักษณะโคโลนีของ *A. caviae* โดยทั่วไปมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน ขอบเรียบ สีเหลือง หลังจากบ่มเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (TSA : Tryptone Soya Agar) เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 36–37 องศาเซลเซียส คุณสมบัติทางชีวเคมีในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสให้ผลบวก ไม่สามารถผลิตแก๊ซจากกลูโคส (Elcuaz; et al. 1995: 5) ลักษณะที่ทดสอบทางชีวเคมีแสดงให้เห็นดังตาราง 1

ตาราง 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. caviae* (Elcuaz; et al. 1995: 5)

คุณสมบัติทางชีวเคมี	*A. caviae*
Oxidase	+
Catalase	+
Indole	+
H_2S on Kligler	-
Voges-Proskauer	-
Urea hydrolysis	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Arginine dihydrolase	+
Esculin hydrolysis	+
Beta-hemolysis on sheep blood agar	-
Sensitivity to O/129	-
Gelatin hydrolysis	+
Gas from glucose	-
Acid from: Glucose	+
Arbutin	+
Lactose	+
Cellobiose	+
Sucrose	+
Maltose	+
L-arabinose	+
Raffinose	-
Inositol	-
Dulcitol	-
D-sorbitol	-
Salicin	+
Mannitol	+

+ = เกิดปฏิกิริยา, - = ไม่เกิดปฏิกิริยา

1.2 การแพร่ระบาด (Outbreak)

แบคทีเรีย *Aeromonas* มักพบว่ามีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งน้ำที่มีปริมาณอินทรียสารมาก น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน น้ำกร่อย นอกจากนี้ยังพบในดินด้วย การแพร่กระจายโดยติดไปกับขนของนก สัตว์บก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลาน จากสถานที่หนึ่งไปยังอีกสถานที่หนึ่ง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2528: 31) การแพร่ระบาดของพวก motile aeromonad มักมีการติดเชื้อนี้ในสัตว์น้ำหลายชนิด อาจจะเนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ความหนาแน่นของประชากรสัตว์น้ำ มีมลภาวะบางประการที่มีผลโดยตรงต่อการทำให้สัตว์น้ำเกิดภาวะเครียด ส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำทำให้ความต้านทานโรคลดต่ำลงเป็นช่องทางให้เชื้อโรคเข้าทำอันตรายต่อสัตว์น้ำได้ (Snieszko. 1974: 197) หรือเนื่องจากในช่วงระยะเวลาดังกล่าวอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างของน้ำมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพวกแบคทีเรียทำให้เชื้อเกิดการเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งสาเหตุเหล่านี้สามารถทำให้สัตว์น้ำเกิดการติดเชื้อ *Aeromonas* ได้ มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *A. caviae* นี้ในสัตว์ต่างๆ เช่น ปลาเทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) พวกนกทะเล (Gull) (Korkoca; & Boynukara. 2003: 1173) แมลงวัน (*Musca domestica*) (Nayduch;et al. 2005: 74) ตัวอ่อนของปลาเทอร์บอต (*Scophthalmus maximus* L.)(Ringo; & Vadstein. 1998: 227) กบ (*Rana tigerina*) (Pearson; et al. 2000: 186) และปลาที่เพาะเลี้ยงไว้ในแหล่งน้ำจืด (Sugita; et al. 1996: 196) นอกจากจะทำให้เกิดการติดเชื้อในสัตว์หลายชนิดได้แล้วยังพบว่า *A. caviae* ยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของคนได้อีกด้วย โดยได้รับเชื้อผ่านทางการรับประทานอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อทำให้เกิดการติดเชื้อในกระเพาะอาหารและลำไส้ (gastroenteritis) (Vila; et al. 2003: 554) ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะภูมิคุ้มกันอ่อนแอก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *A. caviae* นี้ได้ด้วยเช่นกัน (Namdari; & Bottone. 1990: 837) ได้มีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงในประเทศต่างๆ ได้แก่ สเปน (Vila; et al. 2003: 552) ฟิลิปปินส์ (Leono; et al. 1992: 49) อินเดีย (Alavandi; & Ananthan. 2003: 233) ฮ่องกง (Duthie; et al. 1995: 241) และคิวบา (Escarpulli; et al. 2002: 11) ซึ่ง *A. caviae* ส่วนใหญ่จะแยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วย

1.3 การก่อโรค (Pathogenicity)

กลไกในการก่อโรคของ *A. caviae* นั้นยังไม่มีผู้ทำการศึกษามากนัก และยังไม่เป็นที่รู้แน่ชัด แต่บทบาทในการก่อโรคของ *A. caviae* ส่วนใหญ่ที่ได้มีการรายงานพบคือ โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารของคน เช่น โรคแก้วตาอักเสบ และโรคท้องร่วง

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษในลำไส้ของเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* พบว่าไอโซเลตที่สร้าง enterotoxin จะให้ผลบวกทางชีวเคมีต่อไปนี้คือ lysine decarboxylase, Voges-Proskauer reaction การผลิตแก๊สจากกลูโคส ปฏิกิริยา gluconate oxidation, xanthine hydrolysis และ hemolysis ของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ ซึ่งผลบวกทางชีวเคมีแบบนี้จะพบได้ใน *A. hydrophila* และ *A. sobria* แต่ไม่พบใน *A. caviae* จึงสรุปได้ว่า *A. caviae* อาจก่อให้เกิดโรคได้น้อยกว่า *A. hydrophila* และ *A. sobria* (Turnbull; et al. 1984: 175-180) และจากการทดลองแยกเชื้อจากอุจจาระผู้ป่วยที่เป็นโรคท้องร่วงพบว่ามีเชื้อ *Aeromonas* spp. และพิสูจน์ทราบว่าเป็นเชื้อ *A. caviae* มากกว่า 40 เปอร์เซนต์ของเชื้อ *Aeromonas* spp. ซึ่งส่วนใหญ่จะแยกได้จากระบบทางเดินอาหาร (Altwegg. 1985: 228 - 230; Janda; et al. 1984: 44-47)

จากการศึกษาตัวอย่างอุจจาระของเด็กที่มีอาการท้องร่วง พบ *A. caviae* ในอุจจาระผู้ป่วย 14 คน จากผู้ป่วย 17 คน (ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเด็กทารก) และพบว่ามี *A. hydrophila, A. sobria* และ *Plesiomonas shigelloides* อย่างละหนึ่งไอโซเลตเท่านั้น ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *A. caviae* จะมีอาการท้องเสีย ถ่ายเป็นน้ำเป็นเวลา 1 ถึง 3 สัปดาห์ ซึ่งเด็กทารกพวกนี้ไม่ได้กินนมจากแม่ และอุจจาระมีค่า pH มากกว่า 7.5 เชื้อ *A. caviae* ที่แยกออกมาได้ทั้งหมดรวมถึงเชื้อ *A. caviae* ที่เป็นไอโซเลตไว้ใช้อ้างอิง (*A. caviae* ATCC 15468) จะยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้คน และพบว่า *A. caviae* ยังสร้าง cytotoxin ด้วย เชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งค่า pH แบบนี้พบได้ในระบบทางเดินอาหารของเด็กทารก การยึดเกาะและการสร้าง cytotoxin ของเชื้อ *A. caviae* น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของผู้ป่วยที่เป็นเด็ก และอาจรวมถึงในผู้ใหญ่ด้วย (Namdari; & Botton. 1990: 837-840)

สำหรับการศึกษาการเกาะและการบุกรุกโฮสเซลล์ของ *A. caviae* ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในกลไลของการเกิดโรคในลำไส้ของแบคทีเรีย โดยศึกษาจากปฏิกิริยาร่วมกันของ 43-kDa outer-membrane protein (OMP) ของ *A. caviae* กับ เซลล์ลำไส้ใหญ่ของคน (human enterocyte-like Caco-2 cell line) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเนื้อเยื่อชั้นเดียว (monolayer) พบว่าเซลล์ลำไส้ใหญ่ที่ทำปฏิกิริยากับ 43-kDa OMP หรือ *A. caviae* ที่บ่มกับ rabbit IgG anti-43-kDa OMP จะลดการยึดเกาะของเชื้อ *A. caviae* ซึ่งเห็นได้ว่าเป็นปฏิกิริยาร่วมกันของ OMP กับ basolateral cell receptors ของเซลล์ลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปฏิกิริยาของ 43-kDa OMP กับผิวเซลล์ลำไส้ของคน (HEp-2 cells : human epithelial cells) ก็ให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน จึงเป็นข้อมูลที่สนับสนุนได้ว่า 43-kDa OMP ที่พบใน *A. caviae* มีหน้าที่ที่ใช้ในการยึดเกาะกับเซลล์ลำไส้ของโฮสต์ (Rocha-de-Souza; et al. 2001: 313–319; 2003: 661-667)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของผู้วิจัยอื่นๆ ที่สนับสนุนว่า *A. caviae* ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ (Deodhar; et al. 1991: 853; Wilcox; et al. 1992: 959; Rautelin ; et al. 1995: 51)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 การศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* มีรายงานเพิ่มเติม สามารถพบว่าเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคแก้วตาอักเสบ (keratitis) ซึ่งสันนิษฐานว่าปนเปื้อนมาจากการใส่คอนแทคเลนส์ โดยทดสอบจากการนำสำลีมาป้ายที่เยื่อบุลูกตาของคนที่ใส่คอนแทคเลนส์แล้วเป็นโรคแก้วตาอักเสบ เมื่อนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงแล้วแยกเชื้อออกมาตรวจโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *A. caviae* และมีการสร้าง virulence factors ได้แก่ gelatinase และ protease เมื่อวิเคราะห์ virulence gene ที่ได้จากการทำ PCR ยีนที่พบคือ cytolytic enterotoxin (AHCYTOEN) และ *tap* virulence genes ซึ่งยีนเหล่านี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคแก้วตาอักเสบ (Pinna; et al. 2004: 348-351)

แบคทีเรีย *A. caviae* นอกจากจะทำให้เกิดการติดเชื้อในคนได้แล้วยังพบว่ามีการติดเชื้อในสัตว์น้ำได้ด้วยเช่นกันแต่ไม่พบว่าก่อให้เกิดโรคแก่สัตว์น้ำ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักไม่ค่อยประสบปัญหาจากแบคทีเรีย *A. caviae* เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้จะไม่ก่อโรครุนแรงในสัตว์น้ำเหมือนในกรณีที่พบ *A. hydrophila* และ *A. sobria* (Cipriano; et al. 2001: unpaged) อาจเนื่องจาก *A. caviae* ไม่มีการสร้าง virulence factors บางตัว หรือมีการสร้างได้น้อยกว่าใน *A. hydrophila* และ *A. sobria* (Santos; et al. 1988: 3288; Paniagua; et al. 1990: 352)

1.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค (virulence factors)

ปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการก่อโรคได้แก่ ความสามารถในการยึดเกาะและบุกรุกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุ (Krzyminska; et al. 2003: 277) การยึดเกาะนี้แบคทีเรียจะสร้างสารแอดฮีซิน (adhesins) บนผิวเซลล์และเซลล์โฮสต์มีรีเซพเตอร์ที่จำเพาะที่เป็นสารไกลโคโปรตีน หรือไกลโคลิพิดที่จับกับแอดฮีซินได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2539: 23) เมื่อมีการยึดเกาะกับผิวเซลล์ แบคทีเรียก็จะมีการสร้างสารพิษออกมาซึ่งมีผลให้เกิดโรคต่อโฮสต์ได้

การสร้างสารพิษต่างๆ ของ *A. caviae* พบว่ามีการสร้าง exotoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่แบคทีเรียสร้างและขับออกมานอกเซลล์ ได้แก่ การสร้างสาร cytotoxin ที่ทำลายเซลล์หลายชนิด (Krzyminska; et al. 2003: 277) พวก beta-haemolysin ซึ่งเป็นสารที่ทำลายฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดง (Singh; & Sanyal. 1992: 262), ผลิตสาร siderophores (Santos; et al. 1999: 5612), metalloprotease (Nakasone; et al. 2004: 127; Toma; et al. 1999: 237), lysine (Singh. 1992: 231), protease (Karunakaran; & Devi. 1995: 241), beta-galactosidase (Karunakaran; & Devi. 1994: 245), aerolysin (Monteil; et al. 2004: 21) และสร้างสาร enterotoxin (Acosta; et al. 1991:

329) ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหารและลำไส้ทำให้เกิดอาการท้องเสีย เช่น cholera toxin cross-reactive (CTC) factor (Krzyminska; et al. 2001: 303) รวมถึงการมีโครงสร้างบนผิวเซลล์ของเชื้อเป็น pili และ flagella (ทั้ง polar และ lateral flagella) ไว้ยึดเกาะกับผิวเซลล์ของลำไส้ของคน (HEp-2 cells, Henle 407 cells และ Caco-2 cells lines) (kirov; et al. 2004: 1939) หรือมียีน Tap (type IV pili) (Kirov. 1999: 5447), lateral flagellin gene ทำให้มีการแสดงออกของ lateral flagella ที่ช่วยในการยึดเกาะ (Gavín; et al. 2002: 383) นอกจากจะมีสารพวกนี้เป็นส่วนทำให้เชื้อมีความรุนแรงก่อโรคได้แล้ว ยังมีรายงานพบว่าส่วนประกอบของผนังเซลล์ส่วนนอก (O antigen) (Linnerborg; et al. 1996: 165) ซึ่งเป็นสารประกอบ lipopolysaccharide และ flagella (H antigen) (Atkinson; et al. 1987: 372) ของเชื้อ *A. caviae* ก็มีส่วนทำให้เชื้อมีความรุนแรง

สำหรับการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคของ *A. caviae* ได้มีรายงานถึงเชื้อนี้ว่ามีการผลิตสาร cytotoxin และ enterotoxin ที่เป็นปัจจัยในการก่อโรคในลำไส้ โดยนำ *A. caviae* ที่แยกได้จากอุจจาระ และสิ่งแวดล้อมมาศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อต่อผิวเซลล์ลำไส้ของคน (HEp-2 cells) ที่ได้ทำการเลี้ยงไว้เป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer) แล้วทดสอบการสร้าง cytotoxin ของเชื้อ *A. caviae* พบว่ามีทั้งเซลล์ที่มีลักษณะกลม และเซลล์ตาย ส่วนการทดสอบ enterotoxin พบว่ามี *A. caviae* อยู่ 4 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตสาร enterotoxin ได้พอๆ กับเชื้อ *A. hydrophilla* ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม โดยวิเคราะห์จากอัตราส่วนของน้ำหนักลำไส้ต่อน้ำหนักตัวของหนู ข้อมูลที่ได้นี้เป็นข้อสนับสนุนบทบาทการก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของเชื้อ *A. caviae* (Namdari; & Botton. 1990: 1796 - 1798) และต่อมาได้มีผู้ตรวจพบ hemolysin ของ *A. caviae* ในคนไข้ 6 คนจากตัวอย่างคนไข้ทั้งหมดที่พบว่าติดเชื้อ *A. caviae* 35 คน ซึ่งพบได้จากการสังเคราะห์ oligonucleotide ที่จำเพาะต่อยีนที่สร้าง hemolysin โดยวิธีทาง PCR (Wang; et al. 1996: 3203-3205)

การศึกษา virulence factor ใน *A. caviae* ที่แยกได้จากปลา ซึ่งตรวจพบ aerolysin-related gene โดยวิธีทาง PCR และพบว่ามีการผลิตสาร siderophore ในเชื้อนี้ด้วย (Santos; et al. 1999: 5612-5614)

ส่วนการตรวจหาปัจจัยที่ใช้ในการยึดเกาะของเชื้อ *A. caviae* ตรงบริเวณผิวเซลล์ลำไส้ของคน (HEp-2 cells : human epithelial cells) ซึ่งพบว่าเกี่ยวข้องกับการมี flagella gene ของเชื้อ *A. caviae* เนื่องจากยีนนี้ทำให้แบคทีเรียมีส่วนของ flagellum ที่ใช้ในการยึดเกาะของเชื้อ จากการทดสอบโดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ในแต่ละยีนของ flagella gene แล้วตรวจดูการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) การแสดงออกของแฟลกเจลลิน (flagellin expression) และการยึดเกาะกับ

HEp-2 cells พบว่ามีอัตราการเกิดลดลง ปัจจัยนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการทำให้ *A. caviae* ก่อโรคในลำไส้ได้มากขึ้น (Rabaan; et al. 2001: 4257-4267)

นอกจากนี้ได้มีผู้ที่ศึกษา *A. caviae* เพิ่มเติมพบว่าเชื้อนี้มีการผลิตสาร siderophore และ cholera toxin cross-reactive (CTC) factor ซึ่งมีบทบาททำให้ก่อโรครุนแรงได้มากขึ้น และยังพบว่าเชื้อจะมีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวเซลล์ลำไส้เล็กได้มากขึ้น (Krzyminska; et al. 2001: 303-312)

ในปี ค.ศ. 2004 ได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มความไวในการตรวจ และหาปริมาณของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ *A. hydrophila* และ *A. caviae* ที่แยกมาได้จากโรคทางเดินอาหาร และแผลติดเชื้อ หรือจากปลาที่มีอาการตกเลือด (hemorrhagic septicemia) โดยวิธีทาง PCR การศึกษานี้ได้ตรวจสอบพบ hemolytic/cytolytic enterotoxins และ serine protease activators โดยวิธีทาง PCR จึงสรุปได้ว่า *Aeromonas* ที่แยกได้ มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ virulence factors (Ardi; & Olson. 2004: 11)

1.5 **การรักษา และการควบคุมโรค** (Treatment and Control)

การรักษาโรคท้องร่วง หรือรักษาอาการที่ติดเชื้อ *A. caviae* ในสัตว์น้ำ อาจใช้ยาปฏิชีวนะ ซึ่งต้องมีการศึกษาความไวของเชื้อนี้ต่อยาปฏิชีวนะ (Motyl; et al. 1985: 151–153; Vila; & et al. 2002: 701–702) การรักษาจึงจะได้ผลดี จากรายงานของวิล่า และคณะ (Vila; & et al. 2003: 554) ที่ทำการศึกษาความต้านทานของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *A. caviae* พบว่าเชื้อนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Cefotaxime, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Nalidixicacid, Tetracycline, Trimethoprim/sulfamethoxazole แต่ดื้อต่อยา Ampicillin ซึ่งผลการศึกษานี้ ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความไวของเชื้อต่อยาชนิดต่างๆ ดังนั้นการรักษาการติดเชื้อจาก *A. caviae* จึงต้องใช้ยาปฏิชีวนะให้ถูกต้องเหมาะสม และถูกวิธีไม่ว่าผู้ใช้นั้นจะเป็นบุคคลทางการแพทย์ แพทย์ หรือเกษตรกร ก็ตาม มิฉะนั้นจะพบว่าความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ จะลดลง และเชื้อจะดื้อยา ซึ่งจะเป็นปัญหาต่อไปเกี่ยวกับการรักษาโรค และการควบคุมโรคไม่ให้ระบาด

1.6 **วิธีการตรวจวิเคราะห์**

ในอดีตได้มีรายงานการพัฒนาวิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *A. caviae* ขึ้นมาหลายวิธีทั้งวิธีแบบดั้งเดิม โดยการสังเกตดูลักษณะโคโลนี แล้วย้อมสีแกรมพร้อมทั้งดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537: 52) หรือจากการพัฒนาใช้ selective media ที่ประกอบด้วย ยาปฏิชีวนะ และ chemicals agents ต่างๆ เช่น เกลือน้ำดี (bile salts) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ในการคัดเลือก *Aeromonas* spp. จากอาหาร (Sachan; & Agarwal.

2000: 65-74) อีกทั้งยังสามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อใช้พิสูจน์ทราบว่าเป็น *A. caviae* (Elcuaz; et al. 1995: 5; Pinna; et al. 2004: 349) ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีของ *A. caviae* ได้แสดงไว้ในตาราง 1 แต่การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยานี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้ระยะเวลาในการตรวจนานกว่าจะทราบผล ทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อนี้เป็นไปอย่างล่าช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ก็ยังให้ผลตรวจที่ไม่แน่นอน จึงมีผู้ที่คิดค้นวิธีศึกษาทางโมเลกุล (molecular method) โดยการใช้เทคนิค PCR (Khan; & Cerniglia. 1997: 235) มีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นาน แต่การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางโมเลกุลนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง

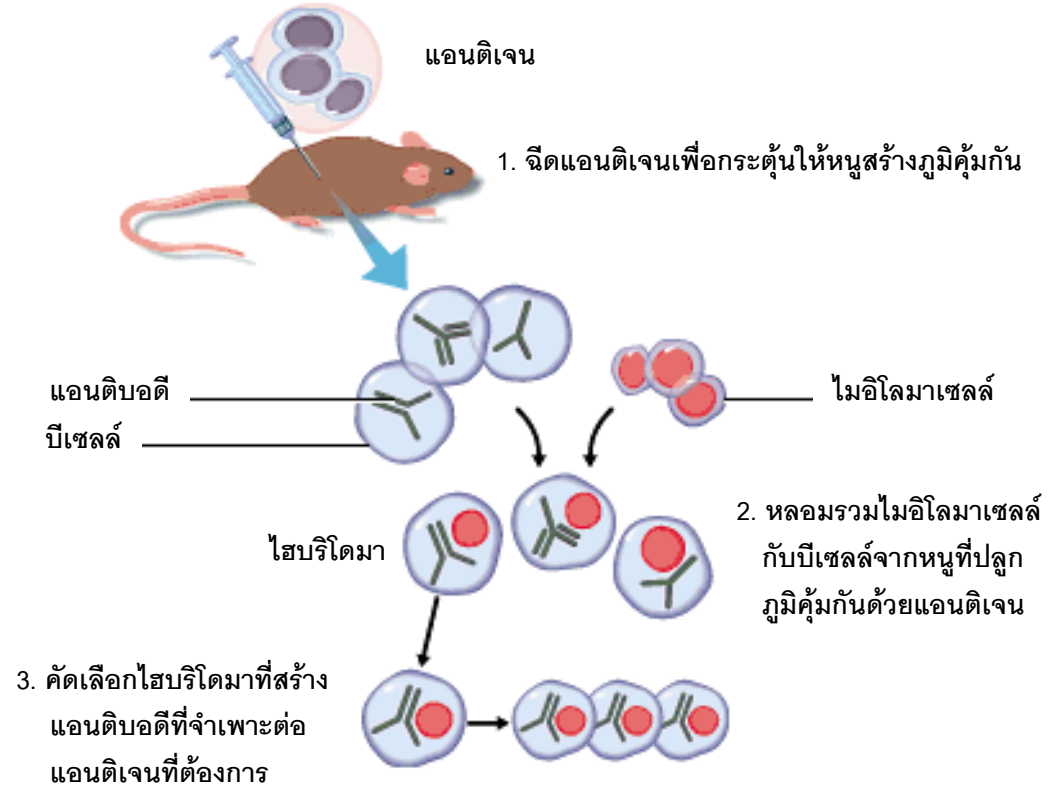
2. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอิพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอิพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอิพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-91)

2.1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้ถูกคิดค้นเป็นผลสำเร็จโดย Köhler และ Milestein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอิโลมาเซลล์ (myeloma cell)

จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่มีอายุจำกัดไม่สามารถมีชีวิตยาวนาน ส่วนไมอิโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ตลอดให้คุณสมบัติความเป็นอมตะ ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุดซึ่งได้คุณสมบัติจากเซลล์มะเร็ง ดังภาพประกอบ 1 เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91)



ภาพประกอบ 1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization

ที่มา: ดัดแปลงจาก http://www.encarta.msn.com/…/ilt/T059309A.gif

2.2 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

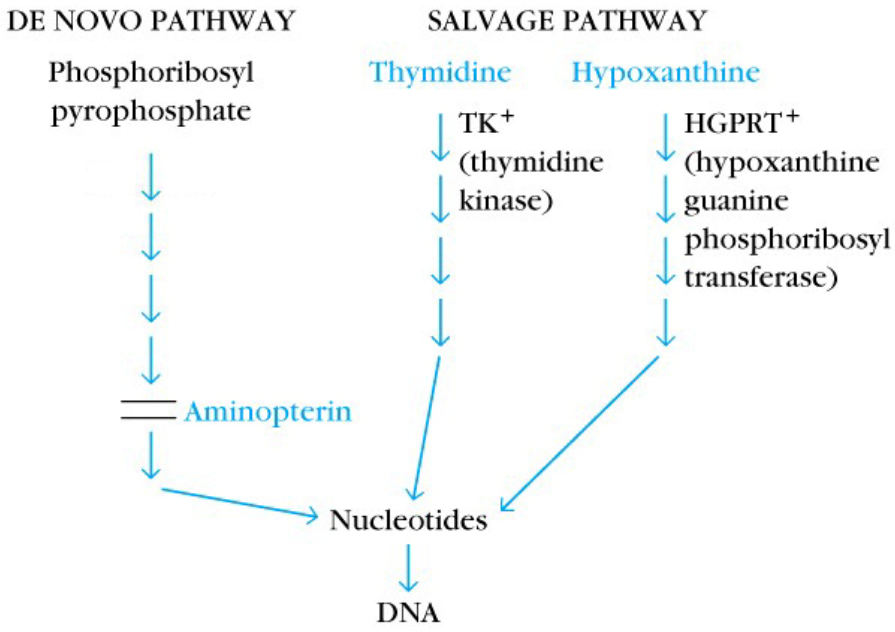
หลังจากที่มีการหลอมรวมไมอิโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีโดยการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่จะมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหา

ภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ การใช้ไมอิโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในขบวนการ salvage pathway คือมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอิโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอิโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 ขบวนการ คือ de novo pathway และ salvage pathwayในกรณีของ de novo pathway (ภาพประกอบ 2) จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อ de novo pathway ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้ salvage pathway โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA แทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน salvage pathway นั้นได้แก่ เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ใน salvage pathway ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวาง de novo pathway ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์ DNA ได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 92)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ไมอิโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT ($HGPRT^-$) และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig^-) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้าม ส่วนไมอิโลมาเซลล์เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้วต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆเช่นวิธี dot-blotting, Western

blotting, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 92-93)



ภาพประกอบ 2 การสังเคราะห์ DNA โดยวิถี de novo และวิถี salvage และการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ในวิถี de novo

ที่มา: http://immuneweb.xxmc.edu.cn/images/figure04-21.jpg

ปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านได้แก่ (1) ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (2) ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการใช้รักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548: 95-97)

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ เช่น ไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ Monodon Baculovirus (MBV) (Boonsanongchokying; et al. 2006: 371), White Spot Syndrome Virus (WSSV) (Chaivisuthangkura; et al. 2004: 359), Hepatopancreatic parvovirus (HPV) (Rukpratanporn; et al. 2005: 85), Yellow Head Virus (YHV) (Sithigorngul; et al. 2002: 71) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเปปไทด์ฮอร์โมนจากก้านตา (Panchan; et al. 2005: 29) และเม็ดเลือด (Winotaphan; et al. 2005: 189) ของกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ออกมา ดังแสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	แอนติเจนที่ใช้	วิธีที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์	เอกสารอ้างอิง
Vibrio parahaemolyticus	Thermostable direct hemolysin	ELISA	Honda; et al. 1989
Vibrio cholerae	Heat stable enterotoxin	ELISA, amino acid sequence	Takeda; et al. 1990
Vibrio spp.	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Chen; et al. 1992
Vibrio harveyi	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Phianphak; et al. 2005
Vibrio vulnificus	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Pusiririt; et.al. 2005
Vibrio alginolyticus	แบคทีเรียทั้งเซลล์	Dot blot, WB, IHC	Sithigorngul; et.al. 2006
Escherichia coli	แฟลกเจลลา	ELISA, WB	He; et al. 1996
Campylobacter jejuni	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Lu; et al. 1997
Bacillus cereus	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Charni; et al. 2000
Photobacterium Damselae piscicida	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB, IHC	Jung; et al. 2001
Bifidobacterium bifidum and *B. longum.*	Cell wall proteins	ELISA, WB	Amrouche; et al. 2006

IHC = Immunohistochemistry, WB = Western blot,

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ก็มีผู้ที่ได้ศึกษาไว้ดังนี้คือ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ไอโซเลต ATCC 7966 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ในการปลูกภูมิคุ้มกัน และจากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี ELISA พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb 5F3) ที่มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ และยังสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophilla* ที่แยกจากแผลติดเชื้อของคน และปลา และอุจจาระของคน เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถจับกับโปรตีนของ *A. hydrophila* ไอโซเลต ATTC 7966 ที่น้ำหนักโมเลกุล 110 kDa และยังแสดงปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ *A. sobria* และ *A. caviae* ด้วย ทำให้สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในอุจจาระของคนได้ (Delamare; et al. 2002: 936-940)

นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ไอโซเลต 1234 ที่มีความจำเพาะแตกต่างกัน 3 กลุ่มคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* 1234 ซึ่งจับกับ lipo-polysaccharide (LPS) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10–190 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 2 จำเพาะต่อ *A. hydrophila* 2 ไอโซเลต (จาก 3 ไอโซเลต) โดยจับกลุ่มของ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5–190 กิโลดาลตัน กลุ่มที่ 3 จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ทั้ง 3 ไอโซเลต *A. sobria* 2 ไอโซเลต และแสดงปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ *A. caviae* โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน ซึ่งพิสูจน์โดยใช้วิธี dot blotting และ Western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อ LPS ของเชื้อ *A. hydrophila* ตรงบริเวณที่แตกต่างกัน ทำให้นำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. hydrophila* ได้ และสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ซึ่งจำเพาะต่อ *Aeromonas* ทุกไอโซเลตมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย *Aeromonas* spp. เบื้องต้นได้โดยวิธี dot blotting (Prahkarnkaeo; et al. 2005)

ส่วนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* นั้นยังไม่พบว่ามีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* ไว้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. caviae* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เพื่อที่จะสามารถแยกการติดเชื้อ *A. caviae* ออกจากเชื้อ *Aeromonas* spp. อื่นๆ ได้ต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument, Germany

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

3. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., Switzerland

4. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius, Germany

5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

6. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท LEICA

7. แท่นอุ่นสไลด์ (Slide warmer) ของบริษัท Medax

8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

9. ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัท Sanyo, Thailand

10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

11. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO_2 Incubator) รุ่น NU-2500V ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.

12. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น NU-201-330E ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.

13. ตู้แช่แข็ง -20°ซ ของบริษัท Sanyo, Thailand

14. ตู้แช่แข็ง -70°ซ ของบริษัท Sanyo, Thailand

15. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany

16. ชุด transblot apparatus ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

17. กล้อง inverted microscope รุ่น IX 70 ของบริษัท Olympus

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A. (ภาคผนวก ก)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A. (ภาคผนวก ก)

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท GIBCO,U.S.A. (ภาคผนวก ค)

4. Fetal bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

5. Calf bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia

6. D-glucose ของบริษัท GIBCO, U.S.A.

7. L-glutamine ของบริษัท GIBCO, U.S.A.

8. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

9. $NaHCO_3$ ของบริษัท AMRESCO

10. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) บริษัท AMRESCO

11. HT supplement ของบริษัท GIBCO, U.S.A.

12. Aminopterin ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

13. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

14. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

15. Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

16. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

17. SDS (sodium dodecyl sulfate) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

18. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

19. SDS molecular weight markers ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

20. ชุดตรวจสอบ Hybridoma sub-isotyping, mouse ของบริษัท Zymed

21. เอทิลแอลกอฮอลล์ (ethyl alcohol) 70%, 80%, 90%, 95% ของบริษัท BDH

22. N-butyl alcohol ของบริษัท Univar

23. ไซลีน (xylene) ของบริษัท Carlo Erba

24. Formaldehyde ของบริษัท Carlo Erba

25. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (ภาคผนวก ช)

26. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10) (ภาคผนวก ช)

27. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

28. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) 30% ของบริษัท SIGMA, U.S.A.

29. อีโอซีน (Eosin Y) 0.02% ในเอทิลแอลกอฮออล์ 95% บริษัท Harleco (ภาคผนวก ช)

30. ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) ของบริษัท Harleco (ภาคผนวก ช)

31. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) ของบริษัท Sherwood

32. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) ของบริษัท DIFCO (ภาคผนวก ช)

33. Davidson's fixative (ภาคผนวก ช)

34. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) ของบริษัท Riedel-de Haen

35. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl) ของบริษัท Merck

36. Permount ของบริษัท Ficther Scientific

37. GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

1. หนู Swiss mice จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

2. ปลานิล ขนาดความยาวลำตัวประมาณ 1 นิ้ว จากตลาดนัดจตุจักร

3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 3)

ตาราง 3 แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน (*) และทดสอบความจำเพาะ

แบคทีเรีย	แหล่งที่แยกเชื้อ	สถาบัน
Aeromonas caviae 13016 (AC1)*	-	NCIMB
A. caviae 22103 (AC2)*	Stool	DMST
A. caviae 22104 (AC3)*	Rectal swab	
A. caviae 22105 (AC4)*	Stool	
A. caviae 22106 (AC5)*	Stool	
A. caviae 24065 (AC6)	Stool	
A. caviae 24066 (AC7)	Stool	
A. caviae 24067 (AC8)	Stool	
A. caviae 24068 (AC9)	Pus	
A. hydrophila 1234 (AH1)	Carp's kidney	VMARC
A. hydrophila 04082 (AH2)	-	AAHRI
A. hydrophila 2798 (AH3)	-	DMST
A. hydrophila 22095 (AH4)	Blood	
A. hydrophila 22096 (AH5)	Stool	
A. hydrophila 22097 (AH6)	Stool	
A. hydrophila 22098 (AH7)	Stool	
A. hydrophila (AH8)	Gold fish	SWU
A. hydrophila 24057 (AH9)	Stool	DMST
A. hydrophila 24058 (AH10)	Stool	
A. hydrophila 24059 (AH11)	Stool	
A. hydrophila 24060 (AH12)	Stool	
A. sobria 12056 (AS1)	-	NCIMB
A. sobria 1234 (AS2)	-	DMST
A. sobria 22099 (AS3)	Stool	DMST
A. sobria 22100 (AS4)	Stool	
A. sobria 22101 (AS5)	Stool	
A. sobria 22102 (AS6)	Stool	
A. sobria 24061 (AS7)	Stool	
A. sobria 24062 (AS8)	Stool	
A. sobria 24063 (AS9)	Stool	
A. sobria 24064 (AS10)	Stool	

ตาราง 3 (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่งที่แยกเชื้อ	สถาบัน
A. veronii 21255 (AV)	-	DMST
A. jandaei 21256 (AJ)	-	DMST
Plesiomonas shigelloides 22107 (PS1)	Rectal swab	DMST
Plesiomonas shigelloides 22108 (PS2)	Rectal swab	DMST
Plesiomonas shigelloides 22109 (PS3)	Rectal swab	DMST
V. cholera (VC)	-	DMSC
V. alginolyticus 22083 (VA)	Food	DMST
V. fluvialis 22087 (VF)	Stool	DMST
V. harveyi 639 (VH)	-	CENTEX
V. mimicus 22089 (VM)	Food	DMST
V. parahaemolyticus 22092 (VP)	Food	DMST
V. campbellii 21361 (V. cam)	-	GB
V. ordalii *(vib 02)* (VO)	UK	DABU
V. penaeicida (V. pen)	-	DMSC
V. vulnificus (VV)	Natural infected	DMSC
Photobacterium damselae damsalae	Sea Bass	DABU
Photobacterium damselae piscicida	Sea bream	UK
Salmonella Typhi	-	DMSM
Salmonella Enteritidis 7108	-	DMST
Escherichia coli ATCC 25922	-	CPF
Enterobacter cloacae	-	DMSM
Shigella flexneri	-	DMSM
Pseudomonas aeruginosa	-	DMSM
Proteus vulgaris	-	DMSM

หมายเหตุ

AAHRI = Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture.

CENTEX = Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology.

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Company Limited.

หมายเหตุ (ต่อ)

DMST	= Department of Medical Science, Ministry of Public Health.
DABU	= Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University.
DMSC	= Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
DMSM	= Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University.
GB	= University of Ghent, Belgium.
NCIMB	= The National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria.
VMARC	= Veterinary Medical Aquatic Research Center, Chulalongkorn University.
UK	= United Kingdom.
-	= ไม่ทราบแหล่ง

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอยที่ไม่ได้เติมเกลือ (NaCl) ในกรณีของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอยที่เติม NaCl เข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลี้ยงและคัดเลือกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม แล้วดูดเซลล์เก็บให้อยู่ในรูปสารแขวนลอยใน Phosphate Buffered Saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2 นำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารแขวนลอยเซลล์ด้วย PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 เพื่อใช้สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนู ส่วนแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งนำไปเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติกซอยที่เติมกลีเซอรอล 20% เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมแอนติเจน

นำแบคทีเรีย *A. caviae* 5 ไอโซเลตคือ AC1, AC2, AC3, AC4 และ AC5 ที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 1.1 มาทำให้ตายด้วยความร้อน (heat-killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการแบ่งแบคทีเรีย *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลตออกเป็น 3 ส่วน ส่วนหนึ่งทำแบคทีเรียให้อยู่ในรูปแบบคงสภาพ (heat-killed form) โดยผสมแบคทีเรียกับ PBS ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ส่วนที่สองนำมาทำให้อยู่ในรูปแบบเสียสภาพ (denatured form) โดยผสมแบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพกับ SDS–mercaptoethanol (SDS-treated) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่น ส่วนที่สามจะนำแบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพมาผสมกับ 40% formaldehyde (formalin-fixed) ในอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่น นำเชื้อที่เตรียมได้ทั้ง 3 รูปแบบ มาแบ่งใส่ในหลอด microfuge แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูต่อไป

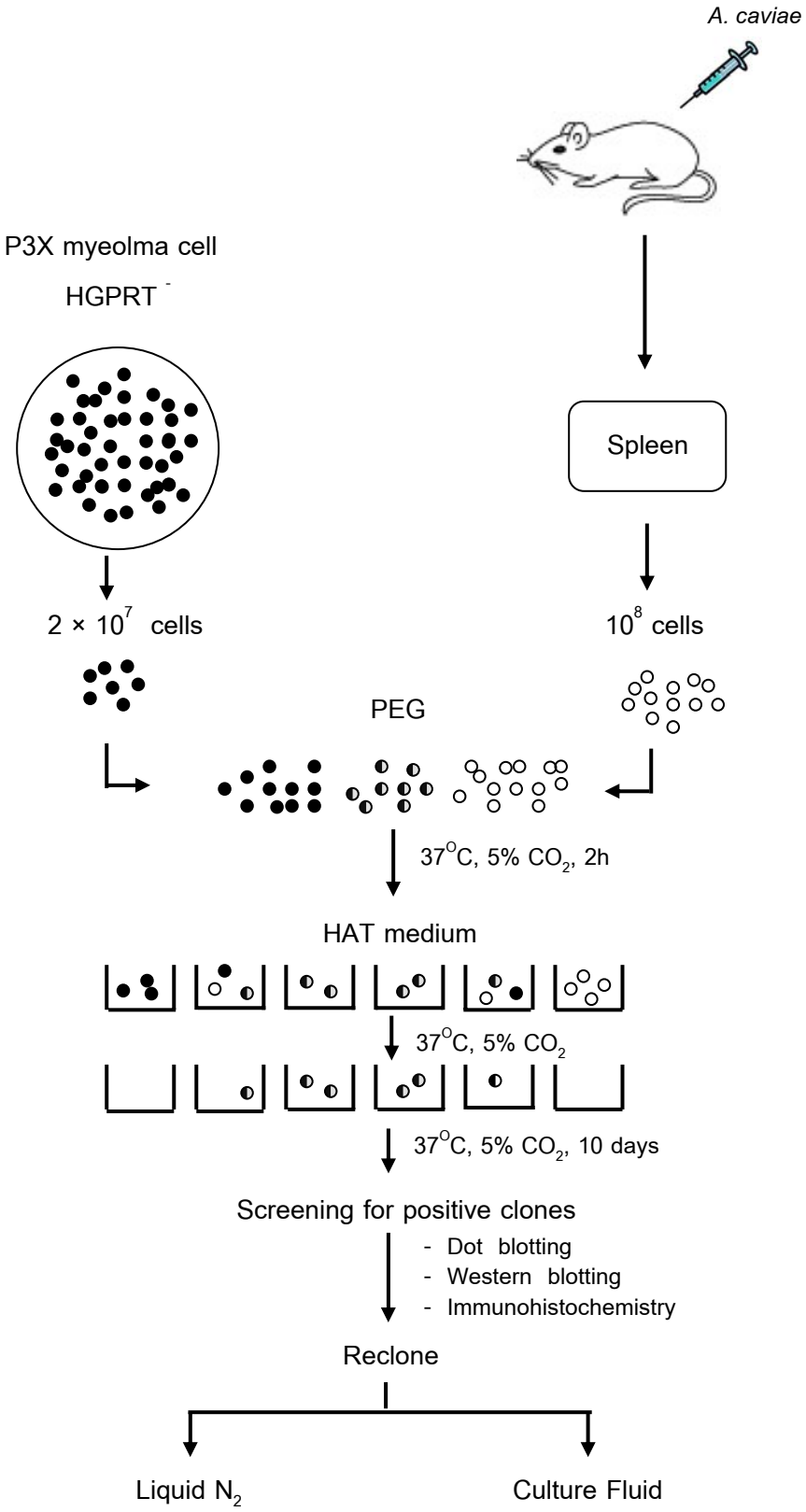
1.3 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว (immunization)

การฉีดกระตุ้นครั้งแรกจะนำแอนติเจนที่เตรียมได้จากวิธีการในข้อ 1.2 (แบคทีเรียทั้ง 3 รูปแบบ) มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาว (Swiss mice) จำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร

หลังจากนั้นทุก 2 สัปดาห์ จะฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง โดยใช้แอนติเจนผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 จะทำการเก็บซีรัม แล้วนำไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *A. caviae* ด้วยวิธี Western blotting แล้วเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาใช้สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

2. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดัดแปลงจากวิธีการที่พัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein (1975; 1976) และ Mosmann และคณะ (1979) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *A. caviae* ตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาทำการฉีดด้วยแบคทีเรียทั้ง 3 รูปแบบที่ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร อีกครั้ง ก่อนการผลิตเซลล์ลูกผสม 3 วัน จากนั้นแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell (เซลล์มะเร็งของหนู) โดยใช้ 40% Polyethylene glycol (PEG) ผสมเซลล์ให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบ 1 นาที แล้วเติม media (RPMI) ที่มีส่วนผสมของ hypoxanthine (H) และ thymidine (T) เพื่อหยุดปฏิกิริยาการหลอมรวมกันของเซลล์ แล้วทำการบ่มเซลล์ไว้ในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) อยู่ 5 % เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกระจายเซลล์ลงเลี้ยงใน 96 wells microculture plate ที่มี RPMI กับ 20% Fetal calf bovine serum (FBS) และ aminopterin (A) จำนวน 20 ถาด เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลาประมาณ 10 วัน ตรวจดูการเจริญของเซลล์ แล้วคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. caviae* โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้วมาทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ แล้วจะเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid N_2) ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะเก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 ไดอะแกรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ดัดแปลงจากไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

3. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

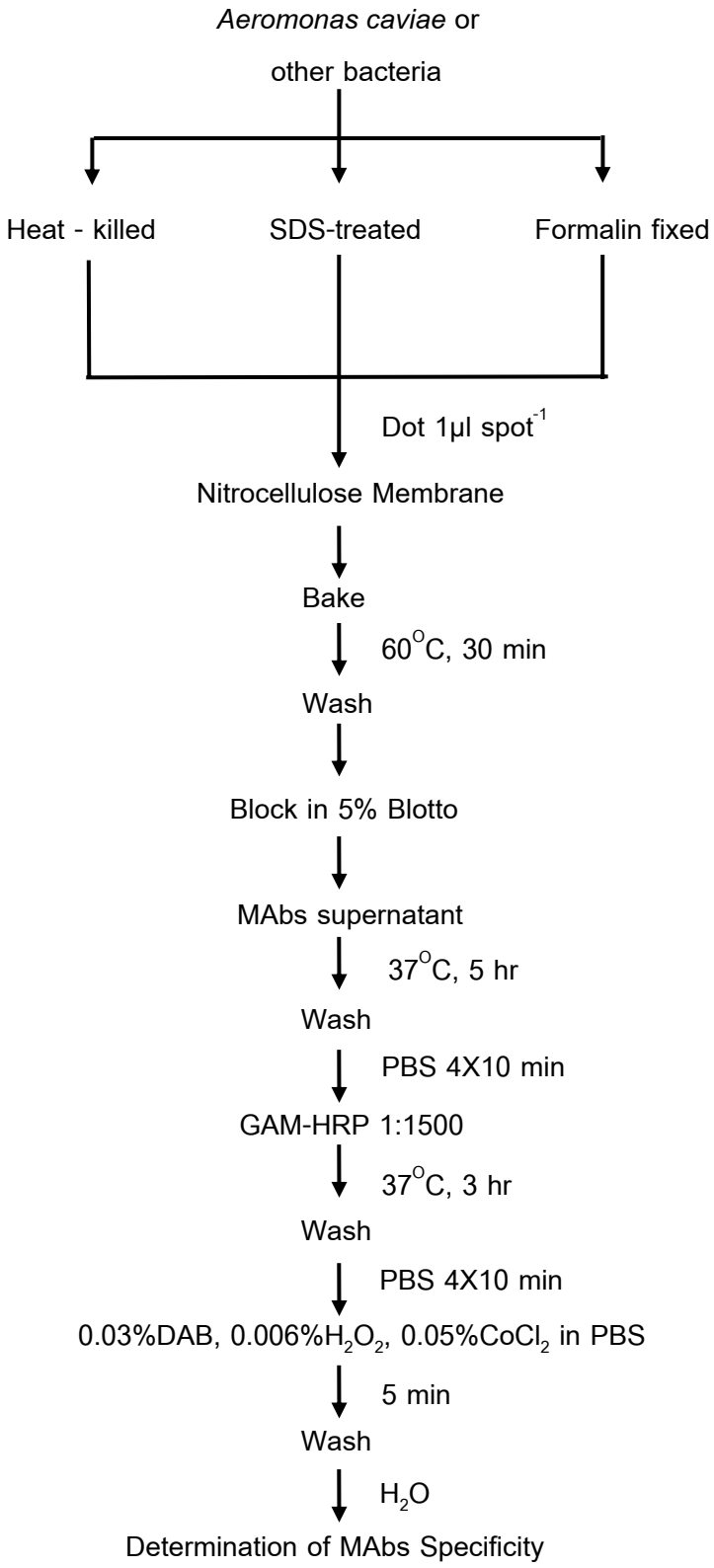
3.1 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting

นำ *A. caviae* ทั้ง 3 รูปแบบมาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse Ig heavy and light chain specific antibody (GAM–HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ละลายใน PBS เลือกไฮบริโดมาโคลนที่ให้ผลบวกต่อ *A. caviae* (ภาพประกอบ 4) แล้วนำไปคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2

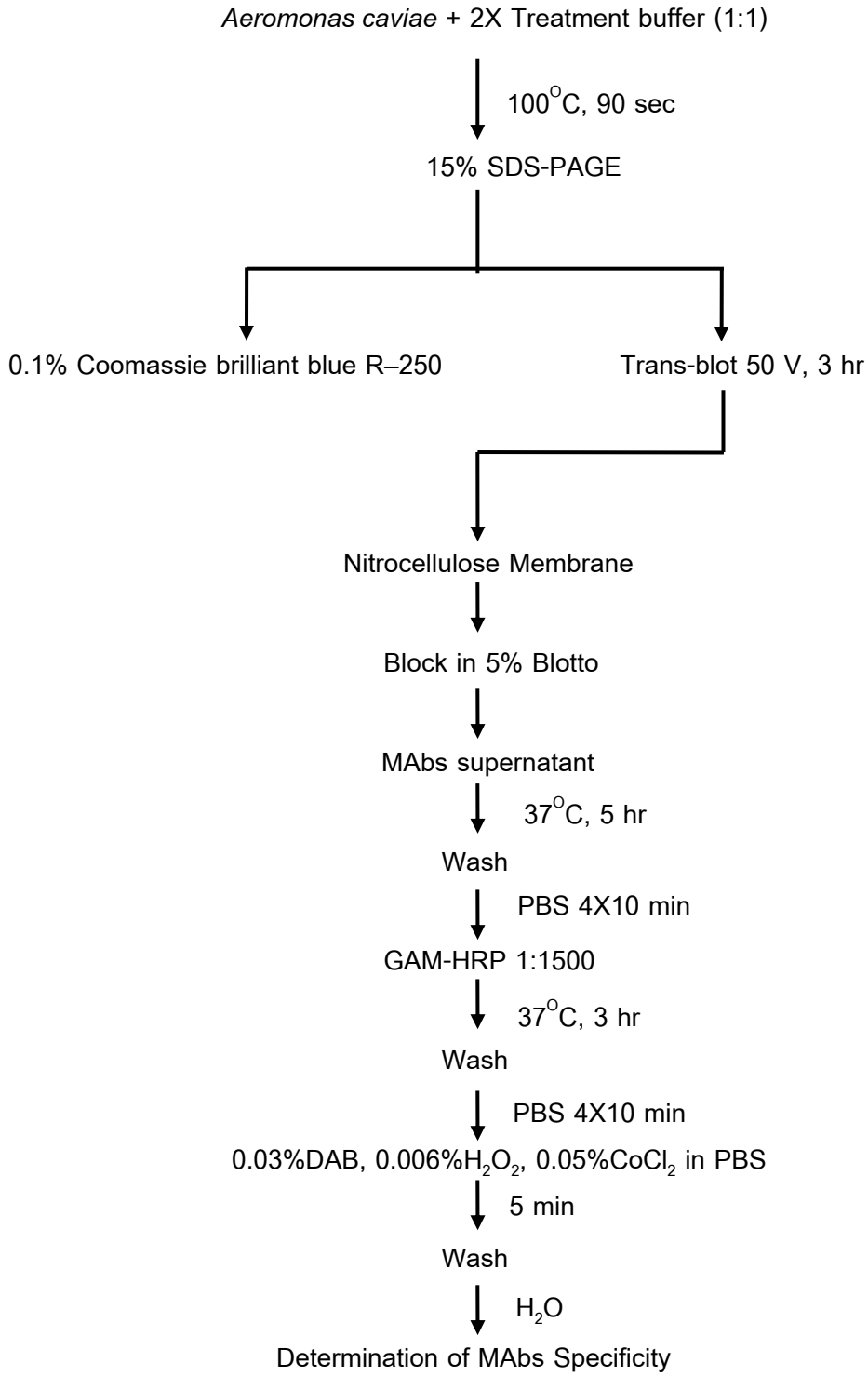
3.2 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2

3.2.1 คัดเลือกโดยวิธี Western blotting

นำ *A. caviae* ในรูปแบบคงสภาพมาแยกบน 15% SDS–PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) โดยใช้ electrophoresis apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดเจลส่วนหนึ่งมาย้อมด้วยสี 0.1% Coomassie brilliant blue R–250 อีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนโดยใช้ transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสแช่ในสารละลาย 5% blotto ตัดแบ่งแล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM–HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, 0.05% $CoCl_2$ ละลายใน PBS ตรวจดูแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 4 ไดอะแกรมการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี dot blotting



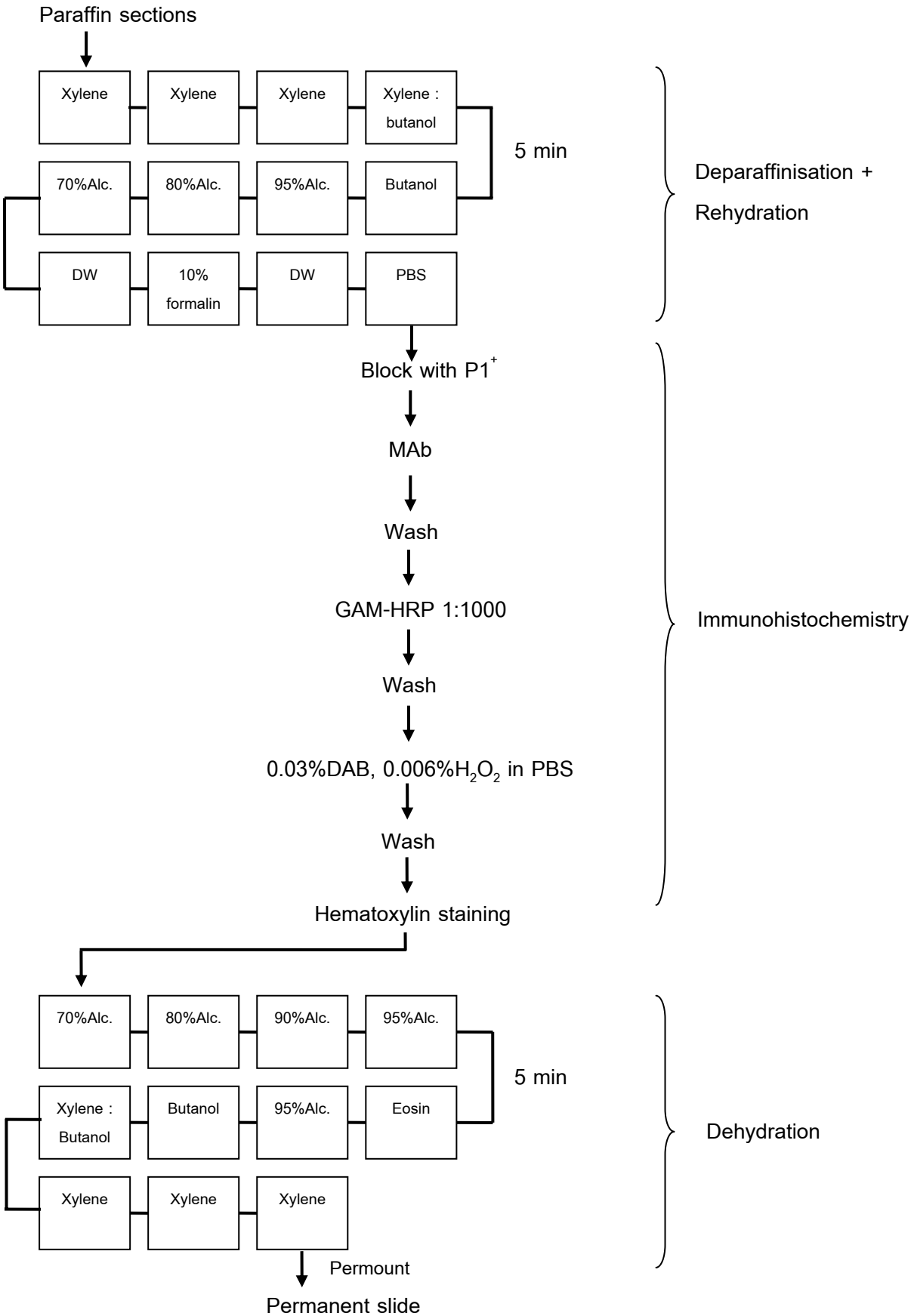
ภาพประกอบ 5 ไดอะแกรมการตรวจสอบลักษณะโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blotting

3.2.2 **คัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม** (cross reaction)

นำ *A. caviae* และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในรูปแบบคงสภาพ ที่ได้แสดงไว้ในตาราง 3 มาหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting ในขั้นตอนที่ 1 แล้ว จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนต่างๆ เหมือนกับในข้อ 3.1 เลือกไฮบริโดมาโคลนที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อ *A. caviae* และไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ หรือแสดงปฏิกิริยากับข้ามแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มากมาทดสอบต่อไป

3.2.3 **คัดเลือกโดยวิธี** immunohistochemistry

นำปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ขนาดตัวยาวประมาณ 1 นิ้ว มาเลี้ยงในถังพลาสติกที่มีการปรับสภาพน้ำให้มีความเค็ม 3 ส่วนในพันส่วน แยกฉีด *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลต เข้มข้น 10^9 CFU/ml ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ตัว โดยฉีดไอโซเลตละ 5 ตัว เข้าตรงบริเวณกล้ามเนื้อด้านหลัง (dorsal) ของปลา เก็บตัวอย่างปลาที่ใกล้ตายแช่ลงในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างปลาด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยนำไปแช่ในแอลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่างๆ บิวทานอล และไซลีน ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้ได้ความหนา 8 ไมครอน ติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน อบให้สไลด์แห้งที่ตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์มาล้างพาราฟิน (deparafinnisation) ออกด้วยไซลีน และนำน้ำเข้าในเนื้อเยื่อ (rehydration) โดยการนำไปแช่ในแอลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่างๆ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่นและ PBS จากนั้น block เนื้อเยื่อด้วย P_1^+ (calf bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง เติม GAM–HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,000 ใน P_1^+ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมด้วยสีอีโอซิน แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และไซลีน หยดทับด้วย Permount ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (ภาพประกอบ 6) นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาทำการโคลนซ้ำ (reclone) และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ เก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้เก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป



ภาพประกอบ 6 การทดสอบ immunohistochemistry. (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

4. การตรวจสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจาก reclone เซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือก จะยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ได้โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 และตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์ class และ subclass ด้วยวิธี sandwich ELISA และตรวจสอบการจับกับอิพิโทปต่างๆ ของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหา *A. caviae* ด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีการดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA

ตรึง *A. caviae* เข้มข้น 2 × 10^6 CFU/ml ซึ่งถูกทำให้เสียสภาพโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ลงที่ก้นหลุมของถาด 96 หลุม (ELISA microtiter plate) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เสร็จแล้วเติมสารละลาย 5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:50 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่างๆ ของถาด 96 หลุม บ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM–HRP เจือจาง 1:1500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มัล ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่าง ๆ ของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) (ภาพประกอบ 7)

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. caviae* โดยวิธี dot blotting

นำ *A. caviae* ในรูปแบบคงสภาพ ซึ่งมีความเข้มข้น 10^9 CFU/ml มาเจือจางแบบ serial ten fold dilution ด้วย PBS แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto จากนั้นนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการทดสอบ นำมาผ่านขั้นตอนเหมือนกับในข้อ 3.1 ตรวจดูระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบจากเชื้อที่เพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่าง

นำเชื้อ *A. caviae* 22105 (AC4) ที่เก็บอยู่ในอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส มาทำการ activate เชื้อในอาหาร TSA จากนั้นนำเชื้อมาปรับค่าการดูดกลืนแสงในสารละลาย PBS ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 (มีแบคทีเรียประมาณ 2×10^9 CFU/ml) นำสารแขวนลอยนี้มาทำการเจือจางแบบ serial ten fold dilution ในอาหาร TSB ที่มีเนื้อปลานิลผสมอยู่ (1:10) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7–10^0 CFU/ml โดยใช้หลอดที่ไม่ได้มีการผสมเชื้อเป็น control บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่บ่มดังกล่าวมาฆ่าด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำเชื้อที่ได้ผ่านการฆ่าด้วยความร้อนแล้วมาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ แล้วนำมาผ่านขั้นตอนเหมือนกับในข้อ 3.1

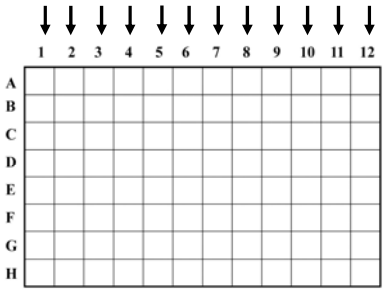
GAM-IgG (1:50) 50 µl/well

↓ $4^{O}C$ overnight

Wash

↓ 0.5% Blotto 4X10min

MAb (1:50) 50 µl/well

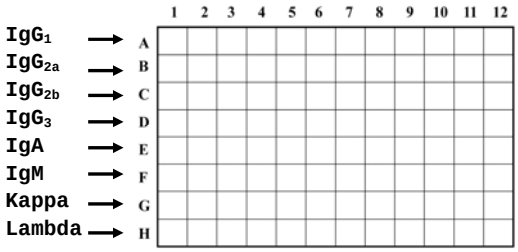


↓ RT 4 hr

Wash

↓ 0.5% Blotto 4X10min

Rabbit Anti-isotype antibodies (1:50) 50 µl/well



↓ RT 1 hr

Wash

↓ 0.5% Blotto 4X10min

GAR-HRP (1:1500) 50 µl/well

↓ RT 4 hr

Wash

↓ 0.5% Blotto 4X10min

OPD 1mg/ml, 0.006% H_2O_2 in citrate buffer pH 4.5, 100 µl/well

↓ RT 5 min

1 N H_2SO_4 100 µl/well

↓ RT 5 min

OD 490 nm

ภาพประกอบ 7 ไดอะแกรมการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. caviae* (AC1 - AC5)

นำ *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลตได้แก่ AC1, AC2, AC3, AC4 และ AC5 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วสังเกตลักษณะการเจริญ ลักษณะของโคโลนี และการติดสีย้อมแกรม พบว่า *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งตรง เมื่อนำมาบ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย (tryptic soy agar) พบว่าโคโลนีมีลักษณะกลม สีเหลืองอ่อน ขนาดใหญ่ ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน ขอบเรียบ ทึบแสง (ภาพประกอบ 8)

(A) (B)

ภาพประกอบ 8 (A) ลักษณะโคโลนีของ AC4 และ (B) แสดงการติดสีย้อมแกรมของ AC4

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่ามีคุณสมบัติเหมือนกัน แต่จะให้ผลการทดสอบ Lysine decarboxylase, Acetoin production (VP), การสร้างแก๊ซจาก Glucose และการผลิตกรดจากน้ำตาล Salicin, Cellobiose, Arabinose แตกต่างจาก *A. hydrophila* และ *A. sobria* อย่างชัดเจน (ตาราง 4)

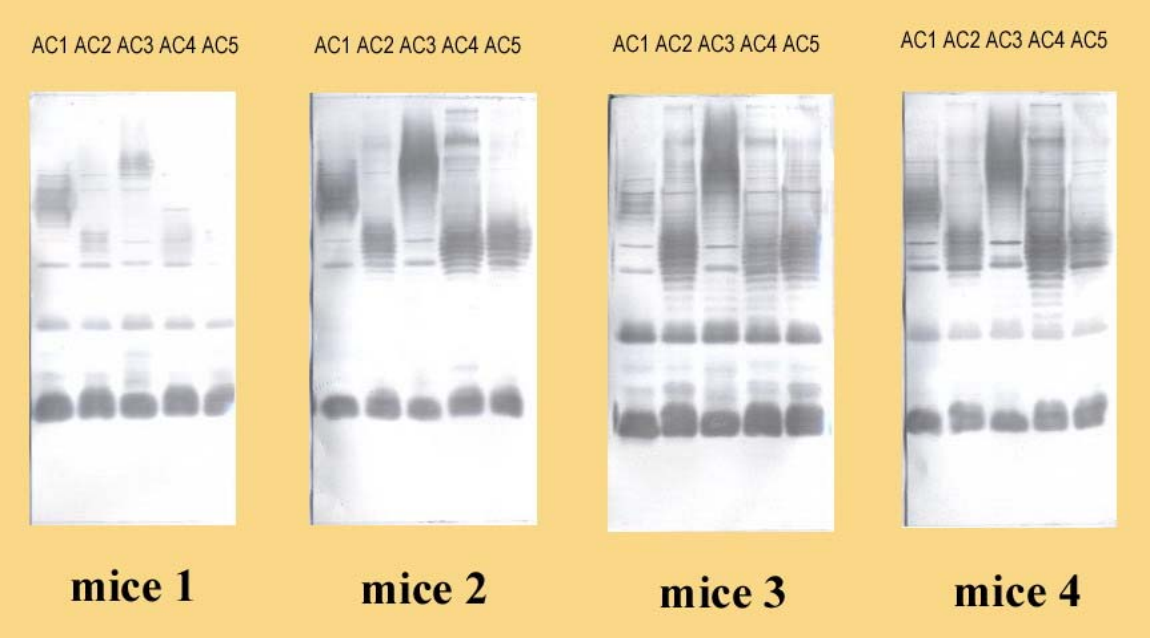
ตาราง 4 ผลทดสอบทางชีวเคมีระหว่าง *A. caviae*, *A. hydrophila* และ *A. sobria*

การทดสอบ	*A. caviae* (AC2)	*A. hydrophila* (AH1)	*A. sobria* (AS4)
Oxidase	+	+	+
Colony on TCBS	NG	NG	NG
NaCl (%) :			
0	+	+	+
3	+	+	+
6	-	-	-
8	-	-	-
10	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	+	+/-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Indole production	+	-	+
Acetoin production (VP)	-	+	+
Gas from glucose	-	+	+
Acid from carbohydrate :			
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Salicin	+	-	-
Cellobiose	+	-	-
Arabinose	+	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	-

+ = ผลบวก, - = ผลลบ, NG = No growth

2. ความจำเพาะของแอนติซีรัม

หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 แล้วเก็บแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัว นำมาทดสอบความจำเพาะกับ *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลต โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวสามารถจับกับแถบโปรตีนของ *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลตได้เป็นจำนวนมากซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 21–146 กิโลดาลตัน โดยหนูตัวที่ 3 ให้ผลการตอบสนองดีที่สุด พบแถบโปรตีนเป็นจำนวนมากและชัดเจนกว่าหนูอื่น ๆ (ภาพประกอบ 9) ดังนั้นจึงใช้หนูตัวที่ 3 สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา



ภาพประกอบ 9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *A. caviae* 13016 (AC1), *A. caviae* 22103 (AC2), *A. caviae* 22104 (AC3), *A. caviae* 22105 (AC4) และ *A. caviae* 22106 (AC5) มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับ mouse-anti *A. caviae* antiserum จากหนูขาวแต่ละตัว (mice 1-4)

3. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่ามี culture media ประมาณ 70 หลุม ที่ให้ผลบวก จากประมาณ 2,000 หลุม โดยแต่ละหลุมมีโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคโลนี และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting, immunohisto-chemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบพบว่ามีไฮบริโดมาโคลนจำนวน 24 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก โดยสามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 12 กลุ่ม (ตาราง 6)

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดลองสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกได้เป็น 12 กลุ่ม ดังนี้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มแรก ประกอบด้วย 9 โคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AC1 (ภาพประกอบ 10-1) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถจับกับแอนติเจนของ *A. caviae* ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 11-B1) แต่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ AC1 ในลำไส้ของปลานิลด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12-2)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 1 โคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AC1 เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 (ภาพประกอบ 10-2) แต่สามารถจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน และแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 80-105 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B2) และสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ AC1 ในลำไส้ของปลานิลได้เช่นกัน (ภาพประกอบ 12-3)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 และ 4 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มละ 1 โคลน ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. caviae* 3 ไอโซเลตคือ AC2, AC5 และ AC7 (ภาพประกอบ 10-3 และ 10-4) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 สามารถจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน และจับกับแถบโปรตีนที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 30-60 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B3) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 จะจับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30-120 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B4) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มสามารถตรวจพบการติดเชื้อ AC5 ในกล้ามเนื้อของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 13-2 และ 13-3)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย 2 โคลน มีความจำเพาะต่อ AC4 (ภาพประกอบ 10-5) โดยจับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30-120 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B5) สามารถตรวจพบการติดเชื้อ AC4 ในลำไส้ของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 14-2)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ AC1 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ AH3, AS5 และ AS7 (ภาพประกอบ 10-6) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50-100 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B6) และสามารถตรวจพบการติดเชื้อ AC1 ในลำไส้ของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 12-4)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย 2 โคลน มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* 2 ไอโซเลตคือ AC2, AC5 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ PS3 (ภาพประกอบ 10-7) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20-150 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B7) และสามารถตรวจพบการติดเชื้อ AC5 ในกล้ามเนื้อของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 13-4)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ AC3 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ AH5, AS1 และ AC9 (ภาพประกอบ 10-8) โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้จับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20-150 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B8) แต่ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อได้ด้วยวิธี immunohistochemistry

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 ประกอบด้วย 2 โคลน มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ทุก species ที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 10-9) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จะจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B9) แต่ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 10 ประกอบด้วย 1 โคลน มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ทุก species ที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 10-10) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จะจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B10) แต่ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 11 และ 12 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มละ 1 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 11 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ทุก species มีปฏิกิริยาข้ามกับ *Plesiomonas shigelloides* 3 ไอโซเลต และ *Vibrio* ส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบยกเว้น *V. ordalii*, *V. penaecida* และ *V. vulnificus* (ภาพประกอบ 10-11) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 12 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ทุก species มีปฏิกิริยาข้ามกับ *P. shigelloides* ไอโซเลตที่ 3 และ *Vibrio* ส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบยกเว้น *V. ordalii* และแสดงปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับ *Escherichia coli* และ *Shigella flexneri* (ภาพประกอบ 10-12) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่ม สามารถจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11-B11 และ 11-B12) แต่ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

5. การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 (AC-3, AC-4, AC-6, AC-7, AC-11, AC-17, AC-23, AC-24, และ AC-34) กลุ่มที่ 5 (AC-1-3D และ AC-14-3F) กลุ่มที่ 6 (AC-30 และ AC-4-9) และกลุ่มที่ 7 (AC-10-2H และ AC-13-10D) ซึ่งเมื่อนำแอนติบอดีในกลุ่ม

เดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง (ตาราง 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันนี้จับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน

6. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

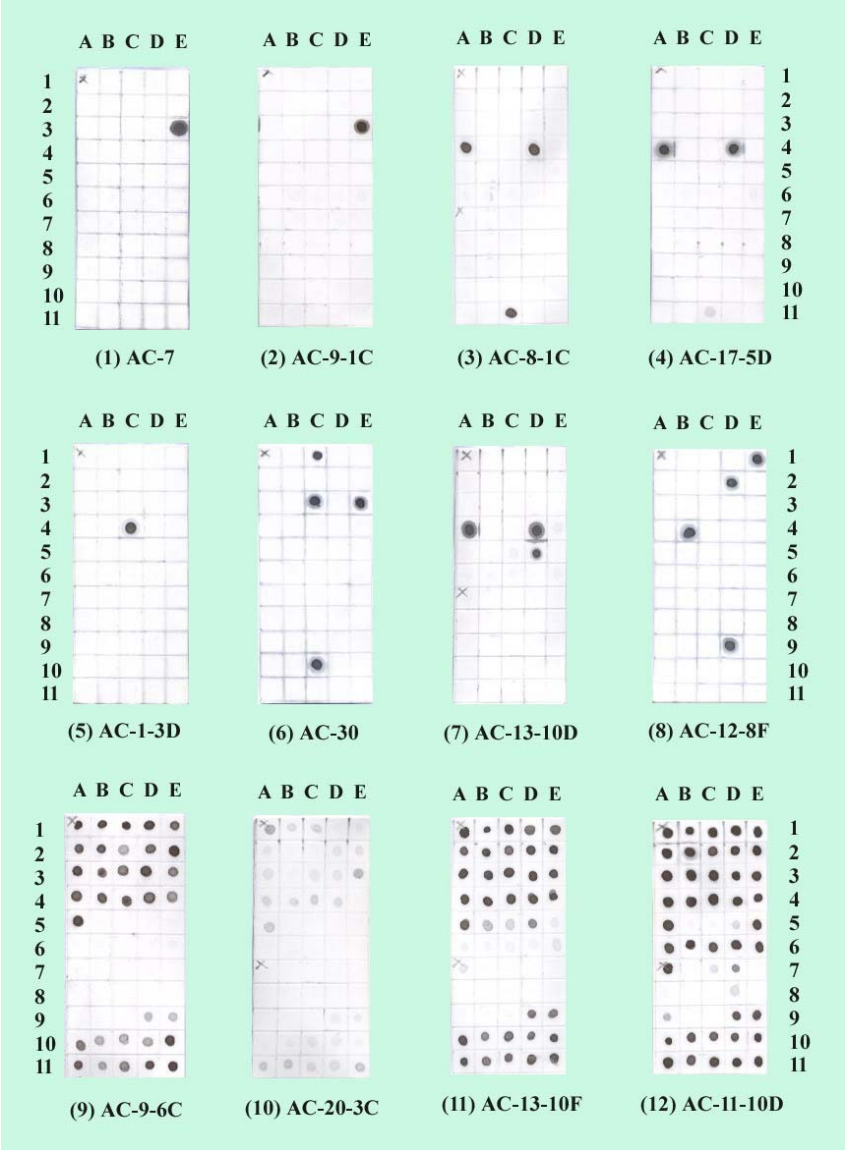
โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 12 กลุ่มที่ผลิตได้มี class เป็น IgG_1, IgG_2a, IgG_2b, IgG_3 และ IgM (ตาราง 6) และ subclass เป็น Kappa

7. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. caviae* โดยวิธี dot blotting

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหา *A. caviae* โดยวิธี dot blotting ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2×10^9 ถึง 1×10^6 CFU/ml ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 มีความไวในการตรวจสูงที่สุด คือที่ 1×10^6 CFU/ml (ตาราง 6 และภาพประกอบ 15)

8. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่ได้เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างปลานิล

หลังจากการบ่มเชื้อ AC4 ในตัวอย่างปลานิลได้ 3 ชั่วโมง พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AC-1-3D สามารถตรวจจับเชื้อ AC4 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 10^3 CFU/ml (ภาพประกอบ 16A) หลังจากทำการบ่มเชื้อตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะสามารถตรวจจับเชื้อ AC4 ได้อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 1 CFU/ml ส่วนการทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AC-9-6C ซึ่งจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. จะมีความไวในการตรวจจับถึง 10 CFU/ml และพบผลบวกที่แถวควบคุมด้วยแสดงว่า ภายในเนื้อเยื่อปลามี *Aeromonas* spp. ปนเปื้อนอยู่จำนวนมาก (ภาพประกอบ 16B) ซึ่งความไวในการตรวจจับ AC4 น่าจะต่ำกว่าเนื่องจาก affinity ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี AC-9-6C ต่ำกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AC-1-3D มาก



ภาพประกอบ 10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ของตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่าง ๆ (1–12) ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนความเข้มข้น 2 × 10^9 CFU/ml ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ กันได้แก่ (1) AC-7, (2) AC-9-1C, (3) AC-8-1C, (4) AC-17-5D, (5) AC-1-3D, (6) AC-30, (7) AC-13-10D, (8) AC-12-8F, (9) AC-9-6C, (10) AC-20-3C, (11) AC-13-10F และ (12) AC-11-10D ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

ภาพประกอบ10 (ต่อ)

แถวที่ 1: *A. hydrophila* (A) AH1; (B) AH2; (C) AH3; (D) AH4; (E) AH5

แถวที่ 2: *A. hydrophila* (A) AH6; (B) AH7; (C) AH8 และ *A. sobria* (D) AS1; (E) AS2

แถวที่ 3: *A. sobria* (A) AS3; (B) AS4; (C) AS5; (D) AS6 และ *A. caviae* (E) AC1

แถวที่ 4: *A. caviae* (A) AC2; (B) AC3; (C) AC4; (D) AC5; (E) *A. veronii*

แถวที่ 5: (A) *A. jandaei*; (B) *Plesiomonas shigelloides* 22107; (C) *P. shigelloides* 22108; (D) *P. shigelloides* 22109; (E) *Vibrio cholerae*

แถวที่ 6: (A) *V. alginolyticus*; (B) *V. fluvialis*; (C) *V. harveyi*; (D) *V. mimicus*; (E) *V. parahaemolyticus.*

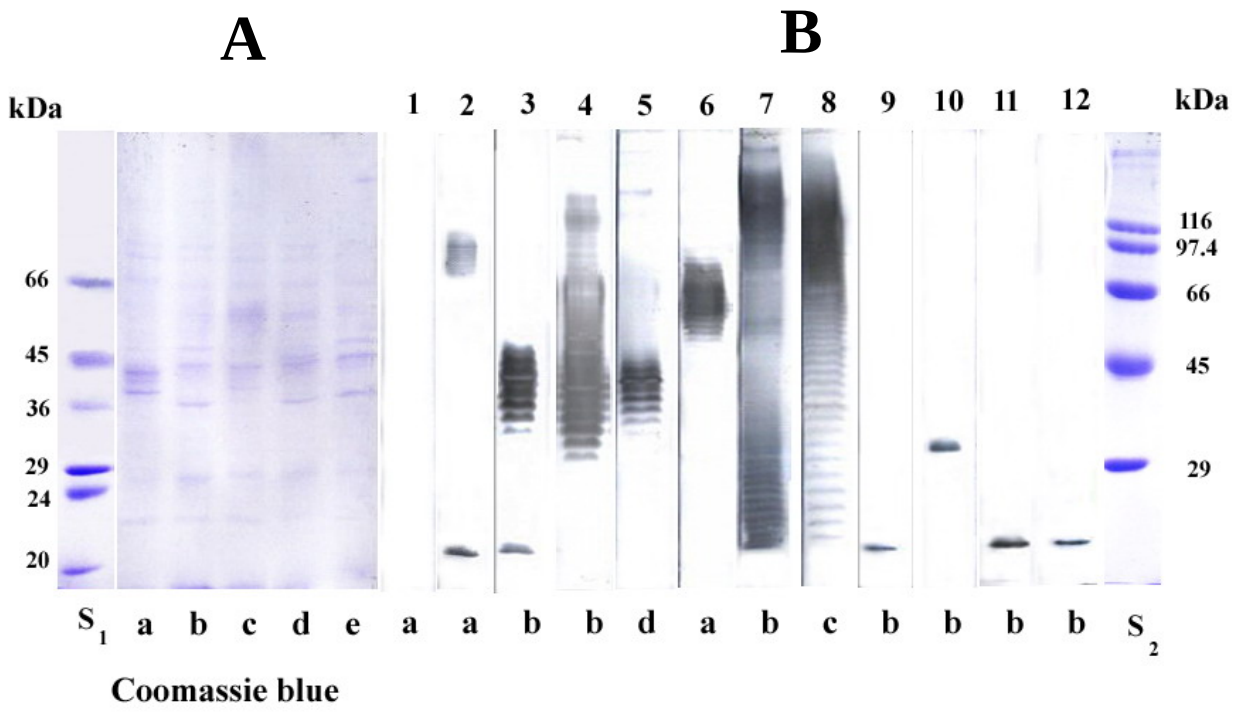
แถวที่ 7: (A) *V. campbellii*; (B) *V. ordalii*; (C) *V. penaecida*; (D) *V. vulnificus*; (E) *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*

แถวที่ 8: (A) *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*; (B) *Salmonella* Typhi; (C) *Salmonella* Enteritidis; (D) *Escherichia coli*; (E) *Enterobacter cloacae*

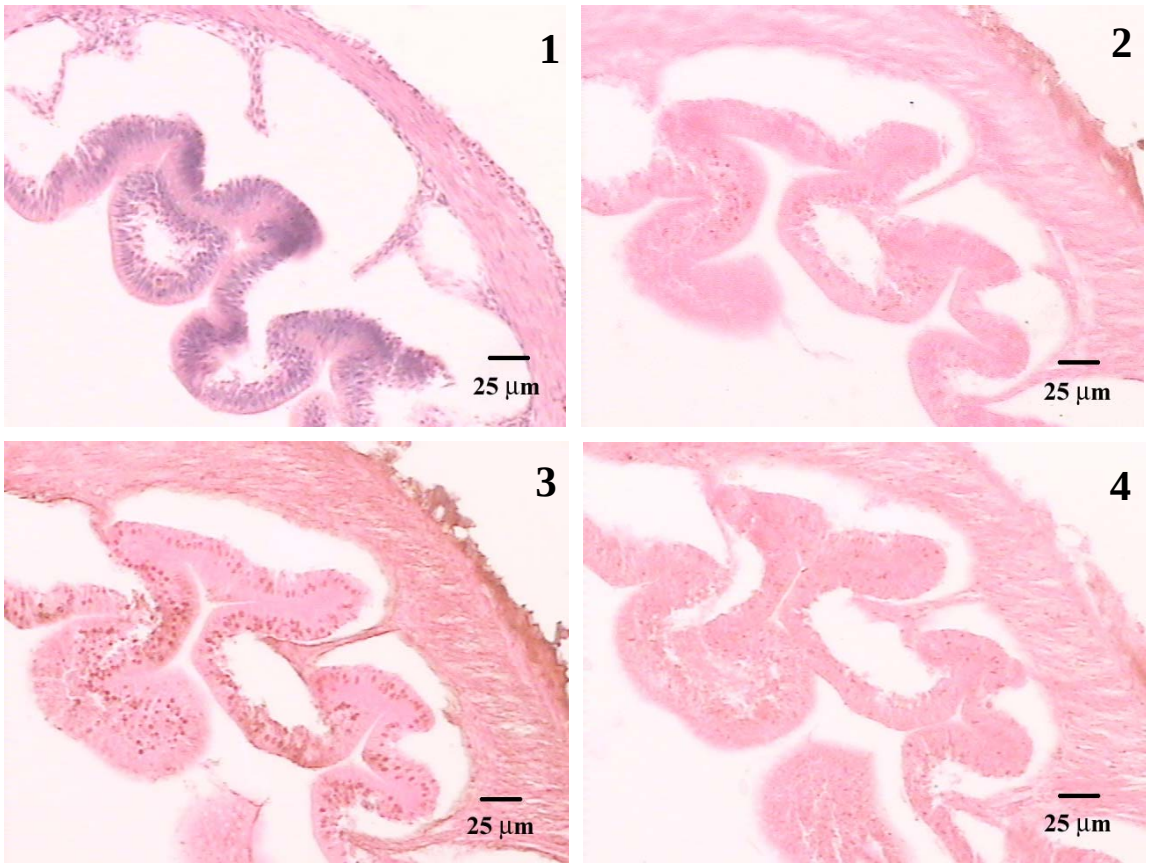
แถวที่ 9: (A) *Shigella flexneri*; (B) *Pseudomonas aeruginosa*; (C) *Proteus vulgaris*; *A. hydrophila* (D) AH9; (E) AH10

แถวที่ 10: *A. hydrophila* (A) AH11; (B) AH12; *A. sobria* (C) AS7; (D) AS8; (E) AS9

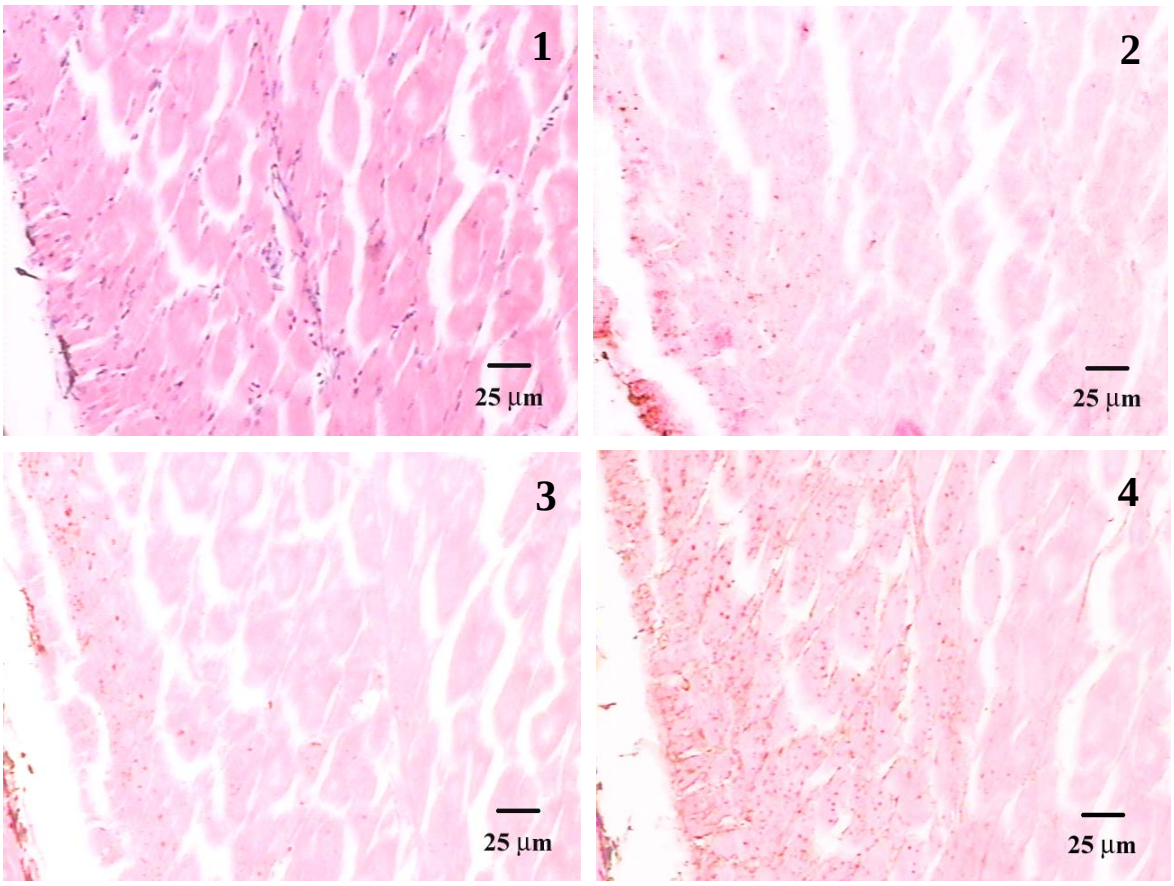
แถวที่ 11: *A. sobria* (A) AS10; *A. caviae* (B) AC6; (C) AC7; (D) AC8; (E) AC9



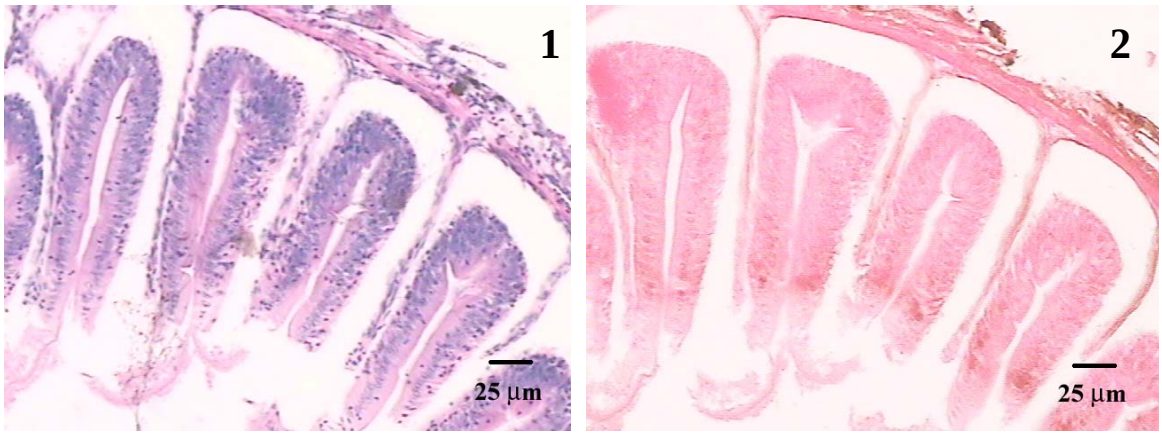
ภาพประกอบ 11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting นำ (A) *A. caviae*: (a) AC1, (b) AC2, (c) AC3, (d) AC4 และ (e) AC5 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS - PAGE) และนำมาย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R–250 (B) แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ ได้แก่ (1) AC-7, (2) AC-9-1C, (3) AC-8-1C, (4) AC-17-5D, (5) AC-1-3D, (6) AC-30, (7) AC-13-10D, (8) AC-12-8F, (9) AC-9-6C, (10) AC-20-3C, (11) AC-13-10F และ (12) AC-11-10D S_1 = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ S_2 = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลสูง



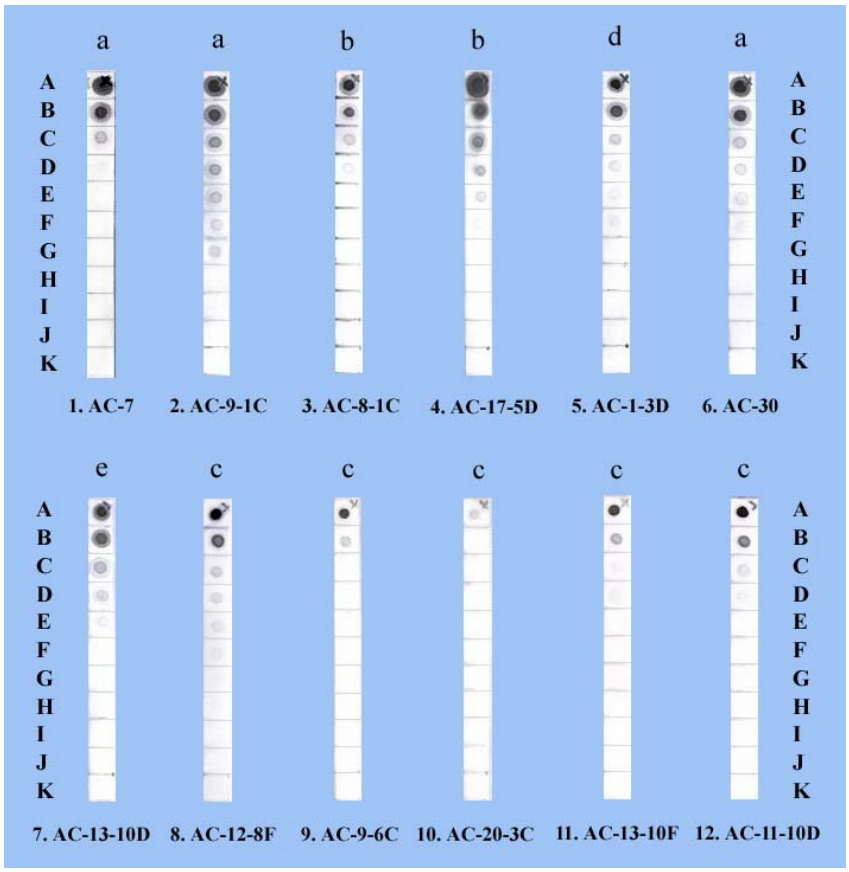
ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบการติดเชื้อ AC1 ด้วยวิธี immunohistochemistry ในลำไส้ของปลานิล ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ AC1 ด้วยวิธีการฉีด (1) เนื้อเยื่อที่ไม่ได้บ่มกับแอนติบอดีนำไปย้อมทับด้วยสี haematoxylin เนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีใน (2) กลุ่มที่ 1 AC-7, (3) กลุ่มที่ 2 AC-9-1C และ (4) กลุ่มที่ 6 AC-30



ภาพประกอบ 13 การตรวจสอบการติดเชื้อ AC5 ด้วยวิธี immunohistochemistry ในกล้ามเนื้อของปลานิล ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ AC5 ด้วยวิธีการฉีด (1) เนื้อเยื่อที่ไม่ได้บ่มกับแอนติบอดีนำไปย้อมทับด้วยสี haematoxylin เนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีใน (2) กลุ่มที่ 3 AC-8-1C, (3) กลุ่มที่ 4 AC-17-5D และ (4) กลุ่มที่ 7 AC-13-10D

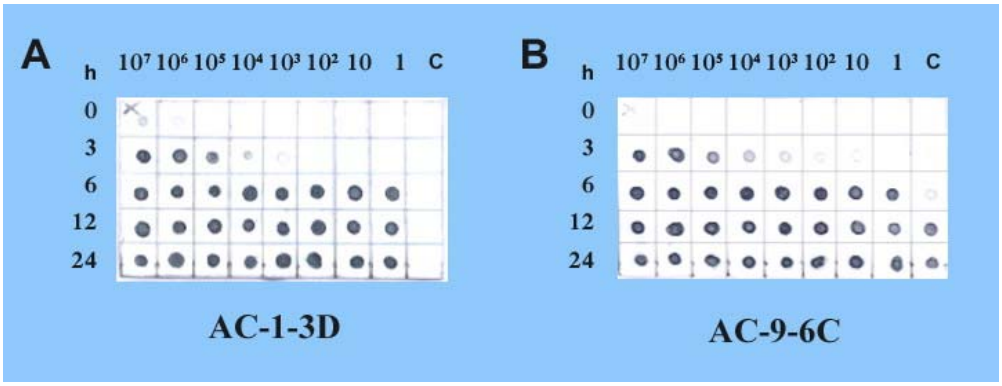


ภาพประกอบ 14 การตรวจสอบการติดเชื้อ AC4 ด้วยวิธี immunohistochemistry ในลำไส้ของปลานิล ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ AC4 ด้วยวิธีการฉีด (1) เนื้อเยื่อที่ไม่ได้บ่มกับแอนติบอดีนำไปย้อมทับด้วยสี haematoxylin เนื้อเยื่ออีกส่วนนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีใน (2) กลุ่มที่ 5 AC-1-3D



ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. caviae* ด้วยวิธี dot blotting โดยหยด *A. caviae*: (a) AC1, (b) AC2, (c) AC3, (d) AC4 และ (e) AC5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 2×10^9 CFU/ml จนถึง 8×10^4 CFU/ml ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มต่างๆ ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว A : 2×10^9 CFU/ml
แถว B : 2×10^8 CFU/ml
แถว C : 2×10^7 CFU/ml
แถว D : 1×10^7 CFU/ml
แถว E : 5×10^6 CFU/ml
แถว F : 3×10^6 CFU/ml
แถว G : 1×10^6 CFU/ml
แถว H : 7×10^5 CFU/ml
แถว I : 3×10^5 CFU/ml
แถว J : 2×10^5 CFU/ml
แถว K : 8×10^4 CFU/ml



ภาพประกอบ 16 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting หลังจากบ่มเชื้อ AC4 ในตัวอย่างปลานิลผสมกับ TSB ที่เวลาต่างๆ (h) และใช้แบคทีเรียความเข้มข้นต่างๆ (C = ไม่ได้มีการผสมเชื้อลงใน TSB) นำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) AC-1-3D ซึ่งมีความจำเพาะต่อ AC4 และ (B) AC-9-6C ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp.

ตาราง 5 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ (เลขยกกำลังเหนือค่า OD: เลขยกกำลังเหมือนกัน คือ จับที่อิพิโทปเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน และเลขยกกำลังต่างกัน คือ จับที่อิพิโทปต่างกัน)

	กลุ่มที่ 1									กลุ่มที่ 2
MAbs	AC 3	AC 4	AC 6	AC 7	AC 11	AC 17	AC 23	AC 24	AC 34	AC 9-1C
AC 3	0.500[1]	0.527	0.456	0.428	0.449	0.441	0.460	0.540	0.490	0.521
AC 4		0.534[1]	0.540	0.554	0.521	0.529	0.525	0.553	0.537	0.606
AC 6			0.131[1]	0.420	0.440	0.151	0.211	0.545	0.528	0.345
AC 7				0.423[1]	0.460	0.415	0.421	0.543	0.517	0.503
AC 11					0.470[1]	0.459	0.472	0.560	0.511	0.546
AC 17						0.162[1]	0.214	0.500	0.535	0.353
AC 23							0.223[1]	0.578	0.542	0.321
AC 24								0.598[1]	0.546	0.625
AC 34									0.550[1]	0.581
AC 9-1C										0.383

ตาราง 5 (ต่อ)

	← กลุ่มที่ 5 →		← กลุ่มที่ 6 →		← กลุ่มที่ 7 →		← กลุ่มที่ 9 →	
MAbs	AC 1-3D	AC 14-3F	AC 30	AC 4-9F	AC 10-2H	AC 13-10D	AC 9-6C	AC 19-10C
AC 1-3D	0.593[1]	0.723						
AC 14-3F		0.732[1]						
AC 30			0.525[1]	0.543				
AC 4-9F				0.210[1]				
AC 10-2H					0.950[1]	0.970		
AC 13-10D						0.876[1]		
AC 9-6C							0.183[1]	0.315
AC 19-10C								0.245[2]

ตาราง 6 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทดสอบด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (IHC) โคลนที่ขีดเส้นใต้เป็นตัวแทนโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละกลุ่มซึ่งใช้ในการทดสอบต่างๆ

Group	MAbs (isotype)	Sensitivity dot blotting (CFU/ml)	Antigen Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (dot blotting)
1	AC-7, AC-3, AC-4, AC-6, AC-11, AC-17, AC-23, AC-24, AC-34 (M)	1×10^7	-	++	AC1
2	AC-9-1C (G_2b)	1×10^6	20, 80 - 105	+++	AC1
3	AC-8-1C (G_2b)	1×10^7	20, 30 - 60	++	AC2, AC5, AC7
4	AC-17-5D (G_2b)	3×10^6	30 - 120	++	AC2, AC5, AC7
5	AC-1-3D (G_2a), AC-14-3F (G_3)	3×10^6	30 - 120	+++	AC4
6	AC-30 (G_2a), AC-4-9F (M)	3×10^6	50 - 100	++	AC1, AH3, AS5, AS7
7	AC-13-10D (G_2b), AC-10-2H (G_2a)	5×10^6	20 - 150	+++	AC2, AC5, PS3
8	AC-12-8F (G_2a)	3×10^6	20 - 150	-	AC3, AH5, AH9, AS1
9	AC-9-6C (G_1), AC-19-10C (G_2a)	2×10^8	20	-	*Aeromonas* spp.
10	AC-20-3C (G_2a)	2×10^9	30	-	*Aeromonas* spp.
11	AC-13-10F (G_2b)	1×10^7	20	-	*Aeromonas* spp., PS1-3, Vibrio spp. (excepted VO, VV, V. pen)
12	AC 11-10D (G_2b)	1×10^7	20	-	*Aeromonas* spp., PS3, *Vibrio* spp. (excepted VO), EC, SF

ตาราง 6 (ต่อ)

Aeromonas spp. ประกอบด้วย:

AC1 = *A. caviae* 13016, AC2 = *A. caviae* 22103, AC3 = *A. caviae* 22104, AC4 = *A. caviae* 22105, AC5 = *A. caviae* 22106, AC6 = *A. caviae* 24065, AC7 = *A. caviae* 24066, AC8 = *A. caviae* 24067, AC9 = *A. caviae* 24068,

AH1 = *A. hydrophila* 1234, AH2 = *A. hydrophila* 04082, AH3 = *A. hydrophila* 2798, AH4 = *A. hydrophila* 22095, AH5 = *A. hydrophila* 22096, AH6 = *A. hydrophila* 22097, AH7 = *A. hydrophila* 22098, AH8 = *A. hydrophila* SWU, AH9 = *A. hydrophila* 24057, AH10 = *A. hydrophila* 24058, AH11 = *A. hydrophila* 24059, AH12 = *A. hydrophila* 24060

AS1 = *A. sobria* 12056, AS2 = *A. sobria* 1234, AS3 = *A. sobria* 22099, AS4 = *A. sobria* 22100, AS5 = *A. sobria* 22101, AS6 = *A. sobria* 22102, AS7 = *A. sobria* 24061, AS8 = *A. sobria* 24062, AS9 = *A. sobria* 24063, AS10 = *A. sobria* 24064,

AV = *A. veronii*, AJ = *A. jandaei*

Vibrio spp. ประกอบด้วย

VA = *V. alginolyticus*, VC = *V. cholerae*, VF = *V. fluvialis*, VH = *V. harveyi*, VM = *V. mimicus*, VO = *V. ordalii*, VP = *V. parahaemolyticus*, VV = *V. vulnificus*, V.cam = *V. campbellii*, V. pen = *V. penaecida*

Other bacteria ประกอบด้วย

PS1 = *Plesiomonas shigelloides* 22107, PS2 = *Ples. shigelloides* 22108, PS3 = *Ples. shigelloides* 22109, EC = *Escherichia coli*, SF = *Shigella flexneri*

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่เก็บได้จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวพบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวนั้นให้การตอบสนองต่อแอนติเจนของ *A. caviae* แตกต่างกันออกไป เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนี้มีทั้งรูปแบบ heat killed, SDS-mercaptoethanol treated และ formalin killed ซึ่งวิธีการนี้จะช่วยให้หนูขาวสามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่ออิพิโทปต่างๆ ของแอนติเจนได้หลากหลายมากขึ้น การที่มีอิพิโทปเป็นจำนวนมากทำให้บี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจน และเป็นผลให้มีการกระตุ้นการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม (polyclonal antibodies) ซึ่งพบว่า polyclonal antibodies ที่ผลิตได้จากหนูแต่ละตัวนั้นมีความสามารถในการตอบสนองแตกต่างกันไป (ภาพประกอบ 9) และเมื่อตรวจดูปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว กับแถบโปรตีนต่าง ๆ ของ *A. caviae* พบว่า หนูขาวตัวที่ 3 นั้นให้การตอบสนองที่ดีที่สุดเนื่องจากมีความเข้มของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมากที่สุด ซึ่งน่าจะมี affinity ที่ดีกว่าหนูขาวตัวอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำหนูขาวตัวที่ 3 มาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 24 โคลน ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 12 กลุ่มตามความจำเพาะ (ตาราง 6)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1-5 มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* แต่ละไอโซเลตแตกต่างกันไป (ภาพประกอบ 10) ความหลากหลายของแต่ละไอโซเลตอาจเนื่องจากนำมาจากคนละแหล่งกัน (Faude; & Höfle. 1997: 4534) ทำให้เชื้อ *A. caviae* แต่ละตัวจึงมีส่วนของอิพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างกันไป เมื่อนำมากระตุ้นปลูกภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้มีการสร้างแอนติบอดีที่มีความหลากหลายแตกต่างกันไป จึงทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับได้เพียงบางไอโซเลตของ *A. caviae* เท่านั้น กรณีโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ไม่สามารถจับแอนติเจนในการวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในรูปแบบ heat killed หรือรูปแบบที่ยังไม่เสียสภาพเท่านั้น แต่เมื่อแบคทีเรียหรือแอนติเจนเสียสภาพไป โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้จึงไม่สามารถตรวจจับได้ในรูปแบบ Western blotting ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่ม 2 จะสามารถตรวจจับแอนติเจนของ *A. caviae* ไอโซเลตเดียวกันที่เสียสภาพไปแล้วได้ จึงสามารถตรวจจับได้ด้วยวิธี Western blotting

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6, 7, 8 มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* และแสดงปฏิกิริยาข้าม *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *Plesiomonas shigelloides* บางไอโซเลต (ภาพประกอบ 10) ดังนั้นในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ไปใช้ในการพิสูจน์ทราบ *A. caviae* ซึ่งถ้าให้ผลบวก

จำเป็นต้องนำไปศึกษาทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าเป็น *A. caviae* ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 และ 10 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 10) จึงสามารถนำแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้มาใช้แยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 11 และ 12 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ทุกไอโซเลต และมีปฏิกิริยาข้ามกับ *P. shigelloides* และ *Vibrio* ส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 10) จึงสามารถนำแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้มาใช้แยกแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ด้วยวิธี dot blotting

จากการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่นๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6-12 ด้วยวิธี dot blotting พบว่าเป็นปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน จึงเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีในกลุ่มดังกล่าวนี้ไปจับกับอิพิโทปที่เหมือนกันของแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* และ *Vibrio* ซึ่งสมาชิกของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลนี้อาจจะมีอิพิโทปอยู่ร่วมกันบนผิวเซลล์ ปฏิกิริยาข้ามดังกล่าวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถเกิดขึ้นได้ ดังเช่นในการทดลองของ Takeda และคณะ (1990: 2755) ซึ่งได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ heat stable enterotoxin ของ *V. cholerae* และพบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มไปทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนจาก *V. mimicus* และ *Yersinia enterocolitica* เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* จากการทดลองของ Phianphak และคณะ (2005: 161) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มที่ผลิตได้ไปทำปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ได้ด้วยเช่นกัน

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1-7 พบว่าสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อปลานิลโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12, 13 และ 14) ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้มาใช้ตรวจหาการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Jung และคณะ (2001: 67) ซึ่งได้นำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Photobacterium damselae piscicida* มาใช้ตรวจการติดเชื้อ *P. damselae piscicida* ในเนื้อเยื่อไต, ม้าม และตับของปลากะพง (*Dicentrarchus labrax*) และในการทดลองของ Phianphak และคณะ (2005: 161) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *V. harveyi* และสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจหาตำแหน่งการก่อโรคของ *V. harveyi* ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำได้

จากการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีบางโคลนในกลุ่มที่ 1 (AC-3, AC-4, AC-7, AC-11, และ AC-24) และกลุ่มที่ 2 (AC-9-1C) เมื่อนำแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้มาผสมกันจะมีค่า

เพิ่มขึ้น (ตาราง 5) ซึ่งแอนติบอดีสองกลุ่มนี้จะจับกับอิพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างกันเมื่อทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 11) จึงน่าที่จะนำแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้มาผสมรวมกันเพื่อเพิ่ม affinity ในการจับกับอิพิโทปของ *A. caviae* ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *A. caviae* ได้เพิ่มขึ้น แต่แอนติบอดีบางโคลนในกลุ่มที่ 1 (AC-6, AC-17, AC-23 และ AC-34) เมื่อผสมกับแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 (AC-9-1C) จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง หรือเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย อาจเนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้จับกันที่อิพิโทปเดียวกันของแอนติเจน จึงอาจทำให้แอนติบอดีกลุ่มหนึ่งอาจไปบดบังการจับอิพิโทปของแอนติบอดีอีกกลุ่มหนึ่ง ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีค่าลดลงหรือเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย

จากงานวิจัยของ Khan และ Cerniglia (1997: 233 - 234) ได้ศึกษาตรวจหาเชื้อ *A. caviae* ในตัวอย่างเนื้อปู โดยวิธีทาง polymerase chain reaction (PCR) สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50–100 เซลล์/กรัม ของเนื้อปู สำหรับการตรวจสอบโดยวิธีทาง PCR นี้จะใช้เวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมง และจากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในงานวิจัยนี้โดยทดสอบด้วยวิธี dot blotting กับเชื้อ AC4 ที่ได้เลี้ยงในตัวอย่างปลานิล พบว่าหลังจากบ่มเชื้อ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะสามารถตรวจพบ *A. caviae* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 CFU/ml โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี AC-1-3D ซึ่งจะเห็นว่ามีความไวสูงเทียบได้กับ PCR โดยใช้เวลาหลังจากเตรียมตัวอย่างใกล้เคียงกัน และเมื่อทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AC-9-6C ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. (ภาพประกอบ 10) พบว่าให้ผลบวกที่ control ด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากตัวอย่างปลานิลที่นำมาทดลองนี้อาจจะติดเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* spp. และแบคทีเรียต่างๆ จากในแหล่งน้ำธรรมชาติมาอยู่ก่อนแล้ว ซึ่งแอนติบอดีนี้สามารถตรวจพบ *Aeromonas* spp. ที่ 6 ชั่วโมง หลังบ่มเชื้อเช่นกัน

สำหรับงานวิจัยนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 24 โคลน โดยแบ่งออกได้เป็น 12 กลุ่มตามความจำเพาะคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 และ 2 มีความ จำเพาะต่อ AC1 กลุ่มที่ 3 และ 4 มีความจำเพาะต่อ AC2, AC5 และ AC7 กลุ่มที่ 5 มีความจำเพาะต่อ AC4 กลุ่มที่ 6, 7 และ 8 มีความจำเพาะต่อ *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *P. shigelloides* บางไอโซเลตและสามารถนำไปใช้ในการตรวจหา *A. caviae* ด้วยวิธี dot blotting ได้ แต่ต้องทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าเป็น *A. caviae* กลุ่มที่ 9 และ 10 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ ส่วนกลุ่มที่ 11 และ 12 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ทุกไอโซเลตเช่นกัน และมีปฏิกิริยาข้ามกับ *P. shigelloides* และ *Vibrio* ส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบด้วย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1-5 สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์ทราบ *A. caviae* เนื่องจากไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Aeromonas* spp. ต่างๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 9 และ 10 สามารถนำไปใช้แยก *Aeromonas* spp. ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 11 และ 12 สามารถนำมาใช้แยกแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ด้วยวิธี dot blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1-7 สามารถนำมาใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้

ดังนั้นจากงานวิจัยครั้งนี้อาจจะนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในกลุ่มที่ 1–5 มาใช้ตรวจหาเชื้อ *A. caviae* และโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 9 และ 10 มาใช้ตรวจหาเชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* spp. ที่คัดแยกจากตัวอย่างหลายประเภทเช่น อาหาร น้ำ และอุจจาระของผู้ป่วยโรคท้องร่วงจากโรงพยาบาลในแหล่งต่างๆ เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ หรือนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาตรวจแทนวิธีทาง PCR ดังในการทดลองของ Khan และ Cerniglia (1997: 233 - 234) ที่ตรวจหาเชื้อ *A. caviae* ในตัวอย่างอาหารและน้ำ หรือการตรวจสอบทางชีวเคมีดังในการทดลองของ Elcuaz และคณะ (1995: 5) ที่ตรวจหาเชื้อ *A. caviae* ในตัวอย่างอุจจาระ ซึ่งน่าจะให้ผลการตรวจหาเชื้อที่แม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น ควรคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1-5 ซึ่งจำเพาะต่อ *A. caviae* เท่านั้น มาพัฒนาชุดตรวจสอบ *A. caviae* แบบสะดวกใช้ ซึ่งอาจพัฒนาร่วมกับเทคนิคทางจุลชีววิทยา โดยการใช้ selective media เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบ *A. caviae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อมซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ในการทดลองนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* เพียง 4 ไอโซเลต จึงยังต้องทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มเพื่อให้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. caviae* ให้ได้ครอบคลุมทุกไอโซเลตต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2528). *โรคปลา*. หน้า 31. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์*. หน้า 52. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2539). *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. หน้า 23. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

พาลาภ สิงหเสนี, ระบิล รัตนพานี และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. (2530). *โรคระบาดในปลาน้ำจืด*. หน้า จ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย*. หน้า 90-100. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

Acosta, B. et al. (1991). *Aeromonas* spp. Isolated from human feces. Species and pathogenicity factors (Abstract). *Enfermedades Infecciosas Microbiologia Clinica*. 9: 329-334.

Altwegg, M. (1985). *Aeromonas caviae*: an enteric pathogen?. *Infection*. 13: 228-230.

Alavandi, S. V. and Ananthan, S. (2003). Biochemical characteristics, serogroups, and virulence factors of *Aeromonas* species isolated from cases of diarrhea and domestic water samples in Chennai. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 21: 233-238.

Amrouche, T. et al. (2006). Production and characterization of anti-bifidobacteria monoclonal antibodies and their application in the development of an immuno-culture detection method. *Journal of Microbiological Methods*. 65: 159–170.

Ardi, V. C. and Olson, B. H. (2004). Increased sensitivity in the detection and quantitation of virulence factors of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* using quantitative PCR (abstract). *Ecology and the Environment*. 68: 11

Atkinson, H. M. et al. (1987). *Aeromonas* adhesion antigens. *Experientia*. 43: 372–374.

Boonsanongchokying, C. et al. (2006). Production of monoclonal antibodies to polyhedrin of monodon baculovirus (MBV) from shrimp. *ScienceAsia*. 32: 371-376.

Chaivisuthangkura, P. et al. (2004). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia*. 30: 359-363.

Chen, P. et al. (1992). Development of monoclonal antibodies the identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3694-3700.

Charni, N. et al. (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2278-2281.

Cipriano, R. C. (1984). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet.* 68.

Colwell, R. R., MacDonell, M.R. and De Ley, J. (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36: 473-477.

Delamare, A. P. L., Echeverrigaray, S., Duarte, K. R., Gomes, L. H. and Costa, S. O. P. (2002). Production of monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identification. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 936-940.

Deodhar, L. P., Saraswathi, K. and Varudkar, A. (1991). *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 853-856.

Duthie, R., Ling, T. W., Cheng, A. F. B. and French, G. L. (1995). *Aeromonas* septicaemia in Hong Kong species distribution and associated disease. *Journal of Infection*. 30: 241-244.

Elcuaz, R. et al. (1995). Peritonitis caused by *Aeromonas caviae* in a patient undergoing peritoneal dialysis. *Clinical Microbiology Newsletter.* 17: 5-6.

Escarpulli, G. C. et al. (2002). Virulence factors of *A. caviae* strains isolated from acute diarrheic disease in Cuba. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 44: 11-13.

Faude, U. C., and Höfle, M. G. (1997). Development and application of monoclonal antibodies for in situ detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4534–4542.

Gavín, R. et al. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 43: 383-397.

He, Y. et al. (1996). Monoclonal antibodies for detection of the H:7 Antigen of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3325-3332.

Honda, T., Ni, Y., Yoh, M. and Miwatani, T. (1989). Production of monoclonal antibodies against thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* and application of the antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay. *Medical Microbiology and Immunology*. 178: 245-253.

Janda, J. M., Reitano, M. and Bottone, E. J. (1984). Biotyping of *Aeromonas* isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum. *Journal of Clinical Microbiology*. 19: 44-47.

Jung, T. S. et al. (2001). The production and characterization of monoclonal antibodies against *Photobacterium damselae* ssp. *piscicida* and initial observations using immunohistochemistry. *Journal of Fish Diseases*. 24: 67-77.

Karunakaran, T. and Devi, B. G. (1994). Factors influencing ß-galactosidase activity of *Aeromonas caviae* (Abstract). *Journal of Basic Microbiology*. 34: 245-252.

Karunakaran, T. and Devi, B. G. (1995). Proteolytic activity of *Aeromonas caviae* . *Journal of Basic Microbiology*. 35: 241-247.

Khan, A. A. and Cerniglia, C. E. (1997). Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. 24: 233–239.

Kirov, S. M., O'Donovan, L. A. and Sanderson, K. (1999). Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea - associated isolated of *Aeromonas* species. *Infection and Immunity*. 67: 5447-5454.

Kirov, S. M., Castrisios, M. and Shaw, J. G. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infection and Immunity*. 72: 1939-1945.

Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256: 495-497.

Krzyminska, S. et al. (2003). Enteropathogenic activity and invasion of HEp-2 cells by *Aeromonas caviae* clinical isolates. *Acta Microbiologica Polonica*. 52: 277-283.

Krzyminska, S. et al. (2001). Enhancement of the virulence of *Aeromonas caviae* diarrhoeal strains by serial passages in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 50: 303-312.

Leaño, F. T. et al. (1992). Toxigenicity of *Aeromonas* strains isolated from patients with and without diarrhea in the Philippines. Phil. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 21: 49-52.

Linnerborg, M. et al. (1996). Structural studies of the O-antigenic polysaccharide from an *Aeromonas caviae* strain. *Carbohydrate Research*. 291: 165-174.

Lu, P. et al. (1997). Characterization of monoclonal antibodies for the rapid detection of foodborne *Campylobacters*. *International Journal of Food Microbiology*. 37: 87-91.

Monteil, C. H., Prévost, G. and Monteil, H. (2004). Virulence factors of clinical *Aeromonas caviae* isolates. *Pathology and Biology*. 52: 21-25.

Motyl, M. R., Mckinley, G. and Janda, J. M. (1985). In vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 28: 151-153.

Nakasone, N. et al. Toma, C., Song, T. and Iwanaga, M. (2004). Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. *FEMS Microbiology Letters*. 237: 127-132.

Namdari, H. and Bottone, E. J. (1990). Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 1796-1798.

Namdari, H. and Bottone, E. J. (1990). Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 837-840.

Nayduch, D. Noblet, G. P. and Stutzenberger, F. J. (2005). Fate of bacteria, *Aeromonas caviae*, in the midgut of the housefly, *Musca domestica*. *Invertebrate Biology*. 124: 74-78.

Paniagua, C. et al. (1990). Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmogairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 350-355.

Panchan, N. et al. (2005). Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. *ScienceAsia.* 31: 29-35.

Pearson, M. D. et al. (2000). Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 40: 185-193.

Phianphak, W. et al. (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 161-168.

Pinna, A. et al. (2004). *Aeromonas caviae* keratitis associated with contact lens wear. *Ophthalmology*. 111: 348-351.

Popoff, M. (1984). Genus III. *Aeromonas*. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1 Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins: 545–548.

Prahkarnkaeo, K. et al. (2005). *Production of monoclonal antibodies specific to Aeromonas hydrophila using whole cell antigens*. M. Sc. (Microbiology). Mahidol university. Photocopied.

Pusiririt, S. et al. (2005). Differentiation of two isolates of *Vibrio vulnificus* with monoclonal antibody. M. Sc. (Biotechnology). Chulalongkorn University. Photocopied.

Rabaan, A. A. et al. (2001). Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*. 69: 4257-4267.

Rautelin, H. et al. (1995). Chronic diarrhea due to a single strain of *Aeromonas caviae* (Abstract). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 14: 51-53.

Ringø, E. and Vadstein, O. (1998). Colonization of *Vibrio Pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 227-233.

Rocha-de-Souza, C. M. et al. (2001). Identification of a 43-kDa outer-membrane protein as an adhesin in *Aeromonas caviae*. *Journal of Medical Microbiology*. 50: 313-319.

Rocha-de-Souza, C. M. et al. (2003). Influence of polarization and differentiation on interaction of 43 kDa outer-membrane protein of *Aeromonas caviae* with human enterocyte-like Caco-2 cell line. *International Journal of Molecular Medicine*. 11: 661-667.

Rukpratanporn, S. et al. (2005). Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 85-89.

Sachan, N. and Agarwal, R. K. (2000). Selective enrichment broth for the isolation of *Aeromonas* sp. From chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*. 60: 65-74.

Santos, Y. et al. (1988). Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity.* 56: 3285-3293.

Santos, J. A. et al. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5612-5614.

Singh, D. V. and Sanyal S. C. (1992). Biochemical characteristics and enterotoxicity of *Aeromonas* species isolated from man and environment (Abstract). *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*. 10: 231-234.

Singh, D. V. and Sanyal S. C. (1992). Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp (Abstract). *Journal of Medical Microbiology*. 37: 262-267.

Sithigorngul, P. et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *Panaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 71-76.

Sithigorngul, W. et al. (2006). Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*. 43: 436–442.

Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*. 6: 197–208.

Sugita, H. et al. (1996). Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*. 145: 195-203.

Takeda, T. et al. (1990). Production of a monoclonal antibody to *Vibrio cholerae* non-o1 heat-stable enterotoxin (ST) which is cross-reactive with *Yersinia enterocolitica* ST. *Infection and Immunity*. 58: 2755-2759.

Turnbull, P. C. B. (1984). Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 19: 175-180.

Vila, J. et al. (2002). In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype sobria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 701-702.

Vila, J. et al. (2003). *Aeromonas* spp. and Traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 552-554.

Wang, G. et al. (1996). Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining presence of a unique hemolysin gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 3203-3205.

Wilcox, M. H. et al. (1992). *Aeromonas* spp. as a potential cause of diarrhea in children. *Journal of Clinical Pathology*. 45: 959-963.

Winotaphan, P. et al. (2005). Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 189-198.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.3 $\pm$ 0.2		

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
โปรตีโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.0	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.0	กรัม
แซคคาโรส (Saccharose)	20.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
เฟอริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe.5H_2O$)	1.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 7.3 $\pm$ 0.2		

3. 15% Glycerol broth

Tryptone soya broth	30	กรัม
Glycerol	150	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	850	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โรซอล (Thimerosal) (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

สารเคมีสำหรับใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6	กรัม
แอล-กลูตามีน (L-glutamine) (Sigma)	0.2923	กรัม
โซเดียมไพรูเวท ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005	กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	2.0160	กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine -N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)	5.9525	กรัม
เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000.0	มิลลิลิตร

กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)		
100 x HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%		
ใน RPMI medium (1)	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100 x HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายสำหรับหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol เข้มข้น 40%)

พอลิเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol)	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มิลลิลิตร

เติม RPMI (1) ลงในพอลิเอธิลีนไกลคอลที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide เข้มข้น 12%)

ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium (1)	88.0	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) และ WESTERN BLOTTING

1. Stock solution

1.1 สารละลายโมโนเมอร์ (30% T, 2.7% C_{Bis})

อะคริลาไมด์ Acrylamide	58.4	กรัม
บิส-อะคริลาไมด์ (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	1.6	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 4X Running gel buffer (tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N

1.3 4X Stacking gel buffer (tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8)

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 N

1.4 SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

Tris เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

1.7 2X Treatment buffer

Tris เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
SDS เข้นข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	2.0	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 การเตรียม separating gel สำหรับ SDS-PAGE 15% gel (15 % T 2.7 % C_{BIS})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15.0	มิลลิลิตร
tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต		
เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	20.0	ไมโครลิตร

2.2 การเตรียม Stacking gel สำหรับ SDS-PAGE 4% gel (4% T 2.7% C_{BIS})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66	มิลลิลิตร
tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์(1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต		
เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์(1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

ตาราง 7 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15 % T 2.7% C_{BIS}	4% T 2.7 % C_{BIS}
30 % T 2.7 % C_{BIS}	15.0 มิลลิลิตร	2.66 มิลลิลิตร
tris-Cl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มิลลิลิตร	-
tris-Cl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5.0 มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	0.3 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75 มิลลิลิตร	12.2 มิลลิลิตร
ผสมและใช้ปั๊มสุญญากาศดึงอากาศออกจากสารละลาย		
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
TEMED	20 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร
ผสมและเทอย่างรวดเร็วลงในช่องระหว่างกระจก		

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

Tris	12.0	กรัม
ไกลซีน	57.6	กรัม
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Staining stock solution (สี Coomassie blue R-250 เข้มข้น 1 %)

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Staining solution

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
เมธานอล	250.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

เมธานอล	500.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

เมธานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อมและล้างเจล

ถอดเจลจากกระจกแช่ในสี Coomassie blue (4.1.2) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ล้างเจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 1 (4.2.1) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา ½-1 ชั่วโมง จนเห็นแถบโปรตีน จากนั้นแช่เจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 2 (4.2.2) จนกระทั่งสีพื้นใสปราศจากสี

5. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma)

- Myosin, rabbit muscle	205	กิโลดาลตัน
- β-Galactosidase, *Escherichia coli*	116	กิโลดาลตัน
- Phosphorylase b, rabbit muscle	97	กิโลดาลตัน
- Fructose-6-phosphate kinase, rabbit muscle	84	กิโลดาลตัน
- Albumin, bovine serum	66	กิโลดาลตัน
- Glutamic dehydrogenase, bovine liver	55	กิโลดาลตัน
- Ovalbumin, chicken egg	45	กิโลดาลตัน

- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle	36	กิโลดาลตัน
- Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29	กิโลดาลตัน
- Trypsinogen, bovine pancreas	24	กิโลดาลตัน
- Trypsin inhibitor, soybean	20	กิโลดาลตัน
- α-Lactalbumin, bovine milk	14.2	กิโลดาลตัน
- Aprotinin, bovine lung	6.5	กิโลดาลตัน

6. Towbin transfer buffer pH 8.8 สำหรับการวิเคราะห์ Western blotting

Tris	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมธานอล	200.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

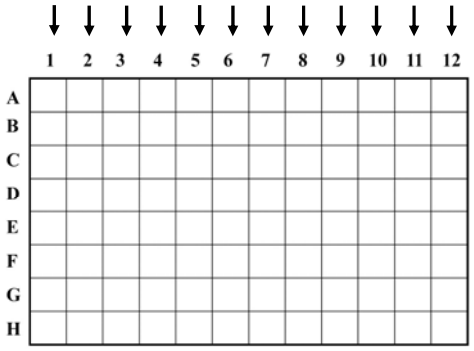
1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ1 chain specific)
2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ2a chain specific)
3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ2b chain specific)
4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ3 chain specific)
5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
9) Normal Rabbit Serum, (Negative Control)
10) Positive Control, Monoclonal Mouse IgG1
    (Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10 % FBS)
11) Substrate Buffer, Concentration (10X)
    (1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03 % H_2O_2)
12) ABTS Substrate, Concentrated (50X)
    (2,2 – azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
13) Blocking Solution, Concentration (50X)
    (25% BSA in PBS and 0.05% NaN_3)
14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
15) Goat anti-Mouse IgGAM, Concentrated (50X)
    (0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
16) 50% Tween 20

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

1. เคลือบถาดหลุม 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

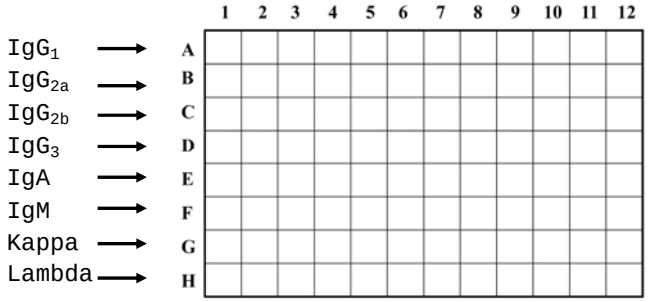
2. สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

3. เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง



4. ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

5. เติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด (1-8) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ A-H



6. ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

7. เติม HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1:1500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8. ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ 10 นาที

9. เติมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย O-phenylenediamine (OPD) 1 มก./มล. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.006% ใน citrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม

10. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก ฉ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มิลลิลิตร
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร

2. สารละลาย 0.5% Blotto

สารละลาย Blotto เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (1)	50.0	มิลลิลิตร
PBS 0.15 M pH 7.2	950.0	มิลลิลิตร

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

โซเดียมซิเตรท	29.41	กรัม
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น)	27.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

5. O-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD)

ภาคผนวก ช

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($CrK(SO_4)_2.12H_2O$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

3. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลาย 10% Calf bovine serum (P_1^+)

Calf bovine serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

สี Hematoxylin	8.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	400.0	มิลลิลิตร
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร.
กลีเซอรีน (Glycerine)	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร

6. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.2	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	100.0	มิลลิลิตร

การทดสอบการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (IHC) และวิธี indirect immunoperoxidase (Sithigorngul และคณะ, 2000; 2002)

1. วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry

1.1 นำปลานิลที่เกิดการติดเชื้อ *A. caviae* ไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับดังนี้

1.3.1 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.2 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง ๆ ละ 24 ชั่วโมง

1.3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.5 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.6 แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง

1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.8 แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที

1.4 นำเนื้อเยื่อของปลานิลที่ผ่านขบวนการในข้อ 1.3 แล้วมาฝัง (embbed) ในพาราพลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องไมโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซคชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิน (ribbon)

1.6 นำ section มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของ section ไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซคชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยืดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกซับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 นำสไลด์ที่มี section มาละลายเอาพาราพลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparafinisation) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันดังนี้

1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.7.2 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.3 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.4 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.5 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 80% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.6 แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.8 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

1.7.9 แช่ในสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที

1.7.10 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.7.11 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.8 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump)

2. วิธี Indirect immunoperoxidase

2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking)

2.2.1 หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละ section ด้วยไมโครปิเปต

2.1.2 บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

2.2.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละ section ออก

2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละ section (แอนติบอดีตัวแรกคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. caviae*)

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจาก section ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละ section ออก

2.3.2 หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุก section

2.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจาก section ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.4 นำ section มาทำปฏิกิริยากับ 0.03% diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% H_2O_2 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

2.5 ล้าง section ด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอิโอซิน

3.1 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

3.2 ย้อมทับด้วยสีอิโอซิน 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% และล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

3.3 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 5 นาที

3.5 แช่ในไซลีนจำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการผนึกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางผนึก (permount)

3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ สกุล	นางสาวหทัยทิพย์ สุขสดใส
วันเดือนปีเกิด	28 กันยายน 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 1626/98 ซอยตึกคู่ฟ้า ถนนดินแดง เขตดินแดง กรุงเทพมหานคร 10400
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสันติราษฎร์วิทยาลัย
พ.ศ. 2548	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2551	วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ