

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*

ปริญญานิพนธ์
ของ
กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2551

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*

ปริญญานิพนธ์
ของ
กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*

บทคัดย่อ
ของ
กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2551

กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล. (2551). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*.
ปริญญาโท วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล,
ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล.

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้
แบคทีเรียทั้งเซลล์จำนวน 8 ไอโซเลต (AH1-AH8) ในการปลูกภูมิคุ้มกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่
ได้สามารถแบ่งออกเป็น 16 กลุ่ม ซึ่งทดสอบกับ *A. hydrophila* 12 ไอโซเลต (AH1-AH12) *A.*
caviae 9 ไอโซเลต (AC1-AC9) *A. sobria* 10 ไอโซเลต (AS1-AS10) และแบคทีเรียอื่นๆ อีก 24 ไอ
โซเลต พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2, 3, 5, 6 และ 7 มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila*
เพียง 1 หรือ 2 ไอโซเลตเท่านั้น โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Aeromonas* ชนิดอื่น โมโนโคลนอล
แอนติบอดีกลุ่มที่ 4, 10, 11 และ 12 มีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* 1-4 ไอโซเลต และแสดง
ปฏิกิริยาข้ามกับ *A. sobria* และ *A. caviae* 1-2 ไอโซเลต โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 และ 9 มี
ความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* 8 ไอโซเลตจากทั้งหมด 12 ไอโซเลต โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี
กลุ่มที่ 8 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. caviae* AC6 และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 แสดง
ปฏิกิริยาข้ามกับ *A. caviae* AC3 และ AC6 โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 13 มีความจำเพาะกับ
A. hydrophila และแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* เกือบทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (*A. caviae*, *A.*
sobria, *A. jandaei* และ *A. veronii*) ยกเว้น *A. hydrophila* AH2, AH11, *A. sobria* AS4 และ *A.*
jandaei โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 14 15 และ 16 มีความจำเพาะกับแบคทีเรียในจีนัส
Aeromonas ทุกไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 16 แสดงปฏิกิริยาข้าม
อย่างอ่อนกับ *Photobacterium damsela damsela* ด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่
สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ ยกเว้นกลุ่ม
ที่ 2, 3, 15 และ 16 และสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2, 3, 5, 6 และ 7 ในการ
พิสูจน์ทราบหรือจำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. hydrophila* ด้วยวิธี dot blotting ได้

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST *Aeromonas hydrophila*

AN ABSTRACT

BY

KANLAYA CHAIYASITTRAKOON

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Biotechnology

at Srinakharinwirot University

May 2008

Kanlaya Chaiyasittrakoon. (2008). *Production of monoclonal antibody against Aeromonas hydrophila*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul, Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

Sixteen groups of monoclonal antibodies (MAbs) against *Aeromonas hydrophila* were generated using whole cells of 8 isolates of *A. hydrophila* (AH1-AH8) for immunization. Twelve isolates of *A. hydrophila* (AH1-AH12), nine isolates of *A. caviae* (AC1-AC9), ten isolates of *A. sobria* (AS1-AS10) and twenty-four isolates of other bacteria were used for cross-reactivity tests. The MAbs in groups 1, 2, 3, 5, 6 and 7 were isolate-specific and bound to only 1-2 isolates of *A. hydrophila* without cross-reactivity to other *Aeromonas* species. The MAbs in groups 4, 10, 11 and 12 recognized 1-4 isolates of *A. hydrophila* but demonstrated cross-reactivity to a few isolates of *A. sobria* and *A. caviae*. The MAbs in groups 8 and 9 bound to eight out of twelve isolates of *A. hydrophila*; however, the MAb in group 8 showed cross-reactivity to one isolate of the *A. caviae* AC6 and the MAb in group 9 showed cross-reactivity to two isolates of the *A. caviae*, AC3 and AC6. The MAb in groups 13 bound to most isolates of *Aeromonas* species tested (*A. caviae*, *A. sobria*, *A. jandaei* and *A. veronii*), except for 2 isolates of *A. hydrophila* (AH2, AH11), one isolate of *A. sobria* (AS4) and *A. jandaei*. The MAbs in groups 14, 15 and 16 bound to all *Aeromonas* species tested. However, the MAbs in group 16 also weakly bound to *Photobacterium damsela*. Most of the generated MAbs could be used to detect *A. hydrophila* infection in tissues by immunohistochemistry except for the MAbs in group 2, 3, 15 and 16. The MAbs in groups 1, 2, 3, 5, 6 and 7 can be used to identify or differentiate isolates of *A. hydrophila* by dot blot assay.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Aeromonas hydrophila*

ของ

กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกุล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่.....เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งขุรุจิ)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ดร.วรรณิภา เพี่ยนภักตร์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ และ ดร.วรรณภา เพียรภักดิ์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิwapร ลงยันต์ และคุณสมบัติ รักประทานพร ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์พันธู์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุน การศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่น้อง และเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่ายิ่งอีกทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุน และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทดลอง และปลานิลทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

กัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของ <i>A. hydrophila</i>	5
การแพร่ระบาด.....	9
การก่อโรค.....	10
ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค.....	11
การรักษา และการควบคุมโรค.....	12
วิธีการตรวจวิเคราะห์.....	13
โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	14
หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	15
การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	15
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค.....	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย.....	21
อุปกรณ์และสารเคมี.....	24
วิธีดำเนินการทดลอง.....	25
การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว.....	25
การเตรียมแบคทีเรีย.....	25
การเตรียมแอนติเจน.....	25
การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว.....	25
การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา.....	26
การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting.....	26
การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2.....	29
การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting.....	29
การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction).....	29
การคัดเลือกโดยวิธี immunohistochemistry.....	31
การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	34
การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	34
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	34
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา	
<i>A. hydrophila</i> โดยวิธี dot blotting.....	35
การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับ	
เชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างปลานิล.....	37
4 ผลของการทดลอง.....	38
การปลูกหมักในหนูขาว.....	38
การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา.....	38
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	38
การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA.....	41
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	42
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา	
<i>A. hydrophila</i> โดยวิธี dot blotting.....	42
การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างปลานิล.....	42
5 การสรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	56
บรรณานุกรม.....	60

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก.....	67
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	85

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>A. hydrophila</i>	6
2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> และ <i>A. caviae</i>	8
3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ.....	19
4 แบคทีเรียต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง.....	21
5 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจน.....	35
6 ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	44
7 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4.....	51
8 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มที่ 5, 6, และ 7.....	52
9 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มที่ 8, 9, 10 และ 11.....	53
10 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มที่ 12, 13, 14, 15 และ 16.....	54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization.....	16
2 การสังเคราะห์ DNA โดย de novo pathway และ salvage pathway และการยับยั้ง การสังเคราะห์ DNA ของ aminopterin ใน de novo pathway.....	17
3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	27
4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี dot blotting.....	28
5 การตรวจสอบลักษณะโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blotting.....	30
6 การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับตัด section.....	32
7 การทดสอบ immunohistochemistry.....	33
8 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	36
9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวทั้ง 4 ตัว.....	43
10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในกลุ่มต่างๆ.....	45
11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting.....	47
12 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Immunohistochemistry.....	48
13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Immunohistochemistry.....	49
14 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา <i>A. hydrophila</i>	50
15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับ เชื้อที่เลี้ยงในตัวอย่างปลา.....	55

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การเพาะเลี้ยงปลาเป็นอาชีพที่สำคัญอย่างหนึ่งของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในประเทศไทย ซึ่งนับวันจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากปลาที่จับได้จากทะเล มหาสมุทร และแหล่งน้ำตามธรรมชาติอื่นๆ มีปริมาณลดน้อยลงไปทุกวัน สภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่ดี เช่น มีมลพิษสูง น้ำเน่าเสีย เป็นต้น ทำให้แหล่งน้ำตามธรรมชาติที่เคยมีปลาอาศัยอยู่ชุกชุม ลดปริมาณลงอย่างต่อเนื่อง การเพาะเลี้ยงปลาจึงมีบทบาทสำคัญมากขึ้น การเลี้ยงปลามีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นทั้งอาหาร กีฬา และความสวยงาม ไม่ว่าวัตถุประสงค์ของการเลี้ยงปลาและวิธีการเลี้ยงจะแตกต่างกันมากน้อยเพียงไร ผู้เลี้ยงปลาจะพบปัญหาที่คล้ายๆ กัน คือ ปลาเป็นโรค ดังที่เกิดโรคระบาดในปลาในช่วงปลายปี พ.ศ. 2525 จนถึงต้นปี พ.ศ. 2526 ในประเทศไทย ซึ่งทำให้ปลาน้ำจืดหลายชนิด ทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติ และในบ่อเลี้ยงเป็นโรค เกษตรกรผู้ประกอบอาชีพเลี้ยงปลาเป็นจำนวนมากได้รับความเสียหายจากปัญหาโรคระบาดดังกล่าว (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2528: 1) เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานการตรวจพบจากที่ต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งในการก่อโรคระบาดในสัตว์น้ำ ได้แก่เชื้อในกลุ่ม *Aeromonas* sp. โดยสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำรุนแรงกว่าสปีชีส์อื่นๆ คือ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* ซึ่งทำให้ปลาที่ติดเชื้อมีอาการหลายอย่าง เช่น ภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) เกิดการตกเลือด (hemorrhage) แผลเน่าเปื่อยตามผิวหนัง (ulcer) (Cipriano; et al. 2001: unpagged) นอกจากนี้ *A. hydrophila* และ *A. sobria* ยังสามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ในมนุษย์ เช่น โลหิตเป็นพิษ ภาวะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) เป็นต้น (Janda; & Abbott. 1996: 151-174)

A. hydrophila เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่ง สามารถเจริญอยู่ได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาศัยอยู่อย่างอิสระได้ในน้ำจืด หรือน้ำกร่อย จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญที่สุดเชื้อหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อและเน่าเปื่อยตามตัวและผิวหนังปลา (Cartwright; et al. 1994: 123) ทำให้ปลามีอาการเลือดออก เลือดคั่ง เป็นแผลลึก มีอาการคั่งของของเหลวภายในช่องท้อง จนเกิดอาการบวม ตาโปน ผิวหนังมีสีเข้มขึ้น เกล็ดปลาดังพองหรือที่เรียกว่า Dropsy เนื่องจากไตไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ โดยไม่สามารถขับน้ำออกสู่ภายนอกได้ ปลาบางตัวเมื่อได้รับเชื้ออาจเกิดเป็นแผลฝีลึก แห้งเป็นรู และตายในที่สุด ซึ่งการแพร่ระบาดของ *A. hydrophila* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของปลาเป็นจำนวนมาก ทั้งในโรงเพาะฟักและตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ในประเทศไทยและหลายพื้นที่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Areerat; 1987: 355-362; Llobrera; & Gacutan. 1987: 273-278) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการติดเชื้อนี้ในสัตว์ชนิดอื่นอีกเช่น แมวน้ำสีเทา (*Halichoerus grypus*) (Krovacek; et al. 1998: 43-49) กบ (*Rana pipiens*) (Hird; et al. 1983: 1423-1425) เต่า (Pasquale; et al. 1994: 1678-1680) สุนัข (Ghenghesh; et al. 1999: 175-179)

และ วัว (Wohlgemuth; Pierce; & Kirkbride. 1972: 1001-1002) เป็นต้น อีกทั้งเชื้อชนิดนี้ยังสามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ด้วย เช่น ภาวะพิษอาหารและลำไส้อักเสบ เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบ (meningitis) ภาวะที่เลือดมีแบคทีเรีย (bacteremia) หลอดลมอักเสบ (bronchitis) เยื่อบุหัวใจอักเสบ (endocarditis) และ เยื่อช่องท้องอักเสบ (peritonitis) (Janda; & Abbott. 1996: 151-174; 1998: 333) เป็นต้น ซึ่งหากสัตว์หรือมนุษย์มีการติดเชื้อนี้แล้วไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาอย่างทันทั่วทั้งที่ อาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์และก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการประมงน้ำจืดทั่วโลก

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีที่ใช้ในการตรวจหา *A. hydrophila* ขึ้นมาหลายวิธี ได้แก่ วิธีการแบบดั้งเดิม (conventional method) ซึ่งใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์ จำแนก และพิสูจน์ทราบชนิด (Vivekanandhan; Hatha; & Lakshmanaperumalsamy. 2005: 133-137) โดยทั่วไปการตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้ระยะเวลานานในการตรวจ จึงทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้ช้า อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ส่วนวิธีทางโมเลกุล (molecular method) โดยการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อ (Baloda; et al. 1995: 17-26; Cascón; et al. 1996: 1167-1170; Wang; et al. 2003: 1048-1054) มีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นาน แต่การตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญสูง ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies) ที่จำเพาะต่อเชื้อนี้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้วินิจฉัยโรคแบบรวดเร็วได้

สำหรับการศึกษารั้วนี้จะเป็นการพัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันสำหรับใช้ตรวจ *A. hydrophila* โดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. hydrophila* ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มพลาสมาเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากบี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) เพียงเซลล์เดียว และมีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่เป็นตัวชักนำให้สร้างแอนติบอดีเท่านั้น ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง โดยแอนติบอดีที่สร้างขึ้นต่อแอนติเจนชนิดนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชนิดเดียวกันนี้ได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนี้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548 : 95) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. hydrophila* นั้น มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ATCC 7966 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ทุกไอโซเลต จำนวน 14 ไอโซเลต แต่มีความจำเพาะอย่างสูงกับ *A. hydrophila* สองไอโซเลตเท่านั้น คือ ATCC 7966 และ CECT 398 (Delamare; et al. 2002: 936-940) ในปีเดียวกันได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* 94030 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะอย่างสูงต่อ *A. hydrophila* 94030 และ 95014 และทำปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ *A. hydrophila* อื่นอีก 16 ไอโซเลต จาก 25 ไอโซเลต โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น (Chanphong; et al. 2002: 355-

360) ต่อมาได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* 1234 โดยสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาใช้จำแนกความแตกต่างของ *A. hydrophila* 1234 จาก *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นๆ ได้ (Prahmkaeo; et al. 2005) ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ *A. hydrophila* ทุกไอโซเลตหรือไม่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างแรงได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงควรที่จะพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. hydrophila* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติด *A. hydrophila* ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ต่อไป

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ เพิ่มเติม เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ มากที่สุด รวมทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Aeromonas* spp. ด้วย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* และ *Aeromonas* spp. ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila*
2. เพื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จำแนก *A. hydrophila* จาก *Aeromonas* spp.

ต่างๆ

ความสำคัญของการวิจัย

สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติด *A. hydrophila* ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ และการติดเชื้อชนิดนี้ในคน ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความไวเพิ่มขึ้นและความสะดวกในการใช้ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. เตรียมแบคทีเรีย และแอนติเจนสำหรับใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
2. เหนี่ยวนำการติด *A. hydrophila* โดยการฉีด *A. hydrophila* ในปลานิลสำหรับใช้ทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry
3. ผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โดยวิธี dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และ คัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม
4. ตรวจสอบคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ โดยวิธี indirect ELISA และ sandwich ELISA

สมมติฐานของการวิจัย

จากการที่ *A. hydrophila* มีแอนติเจนที่มีอิมูโนโตนีตต่างๆ ซึ่งอาจเป็นอิมูโนโตนีตที่มีความจำเพาะต่อไอโซเลตหรืออาจเป็นอิมูโนโตนีตที่มีลักษณะร่วมกันระหว่างสมาชิกในสปีชีส์ ซึ่งหากสามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิมูโนโตนีตเหล่านี้ได้ ก็จะสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้จำแนก *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ ออกจากกัน จำแนก *A. hydrophila* จาก *Aeromonas* spp. และจำแนก *Aeromonas* ออกจากแบคทีเรียอื่นได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล Aeromonadaceae อาศัยอยู่อย่างอิสระในน้ำจืด หรือน้ำกร่อย เชื้อนี้จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญที่สุดเชื้อหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อและเน่าเปื่อยตามตัวและผิวหนังปลา เกิดการตกเลือด ทำให้ปลามีอาการเลือดออก เลือดคั่ง เป็นแผลลึก ผิวตัวมีสีเข้มขึ้น ตาโปน อาจมีอาการคั่งของของเหลวภายในช่องท้อง เนื่องจากไตไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ โดยไม่สามารถขับน้ำออกสู่ภายนอกได้ ทำให้ตัวปลาบวมพอง ผิวหนังยืดขยายจนเกิดอาการเกล็ดปลาตั้งพอง (Dropsy) ปลาบางตัวเมื่อได้รับเชื้ออาจเกิดเป็นแผลฟิสิก แหว่งเป็นรู และตายในที่สุด มีรายงานการตรวจพบเชื้อนี้ทั้งในสัตว์เลื้อยคลาน (Pasquale; et al. 1994: 1678-1680) สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Hird; et al. 1983: 1423-1425) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Krovacek; et al. 1998: 43-49) ในอาหาร และน้ำดื่ม (Daskalov. 2006: 474-483)

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของ *A. hydrophila*

A. hydrophila มีรูปร่างเป็นแท่ง ดัดสี่แตรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีแคปซูล มีขนาดความกว้าง 0.3-1 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 1-4 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้โพลาร์แฟลกเจลลา (polar flagella) มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มมีโซฟิล (mesophile) (Janda; & Abbott. 1998: 332) เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิต่ำสุดที่จะเจริญได้ที่ 5-25 องศาเซลเซียส จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่จะเจริญได้ที่ 43 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 86-87) ให้ผลเป็นบวกในการทดสอบออกซิเดส (oxidase) การทดสอบคาตาเลส (catalase) การทดสอบย่อยสลายเจลาติน (gelatin liquefaction) สามารถผลิตแก๊สจากกลูโคส ไม่ไวต่อ vibriostatic agent (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) ลักษณะที่ทดสอบทางชีวเคมีของ *A. hydrophila* แสดงดังตาราง 1 โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สามารถแยก *A. hydrophila* ออกจาก *A. sobria* และ *A. caviae* เช่น การผลิตแก๊สจากกลูโคส การทดสอบความสามารถในการย่อยเอสคิวลิน (esculin hydrolysis) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S production) และความไวต่อยาปฏิชีวนะเซฟาโลติน (cephalothin susceptibility) ซึ่งแสดงดังตาราง 2 ลักษณะโคโลนีของ *A. hydrophila* โดยทั่วไปมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ตรงกลางโค้งนูน ขอบเรียบ สีขาวนวล เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) และจะมีโคโลนีเป็นสีเหลืองเมื่อเลี้ยงบน Rimler-Shotts medium (RS medium) ซึ่ง RS medium นั้นเป็นอาหารสำหรับ *A. hydrophila* ประกอบด้วยกรดอะมิโนบางชนิด

ตาราง 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. hydrophila* (MacFaddin. 2000: 647)

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>A. hydrophila</i>
Catalase	+
Oxidase	+
Nitrate reduction	+
H ₂ S	+
Motility	+
Brown soluble pigment	-
Glucose	A
Lactose	V
Adonitol	-
Arabinose	A
Cellobiose	-
Dulcitol	-
Erythritol	-
Galactose	A
Glycerol	A
Inositol	-
Maltose	A
Mannitol	A
Mannose	V ⁺
Melibiose	-
Raffinose	-
Rhamnose	-
Salicin	A
Sorbitol	-
Sucrose	A
Trehalose	A
Xylose	-
Indole	+
DNase	+

ตาราง 1 (ต่อ)

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>A. hydrophila</i>
Citrate (Simmons)	V
Esculin hydrolysis	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	V
Ornithine decarboxylase	-
Gelatin liquefaction, 22°C	+
KCN	G
Lipase	V
Malonate	-
ONPG	+
Phenylalanine deaminase	-
Methyl red (MR)	+
Voges-Proskauer (VP)	+
Urease	-
0/129	R

+ = 90-100% ให้ผลบวก, - = 0-10% ให้ผลบวก, V = มีความแปรผัน, V⁺ = มีความแปรผันแต่ให้ผลบวก 76-90%, G = สามารถเจริญได้, R = มีความต้านทาน, A = ผลิตรวด, 0/129 = vibriostatic agent (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine)

และเติมยาปฏิชีวนะโนโวไบโอซิน (novobiocin) กับโซเดียมดีออกซีโคเลต (sodium deoxycholate) ลงไปด้วย เพื่อเป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* ถ้ามีแบคทีเรียในจีนัส *Escherichia*, *Enterobacter* และ *Pseudomonas* จะเห็นโคโลนีขึ้นมาเป็นสีเขียว และแบคทีเรียในจีนัส *Edwardsiella* จะเห็นโคโลนีเป็นสีเขียวและมีสีดำตรงกลาง อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ต้องบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเจริญของ *A. salmonicida* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มไซโครไฟล์ (psychrophile) (Janda; & Abbott. 1998: 332) สามารถเจริญได้ที่ 15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญคือ 30 องศาเซลเซียส (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 86) ซึ่งจะเจริญขึ้นมามีโคโลนีเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกับ *A. hydrophila*

ตาราง 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* (Cipriano; et al. 2001: unpagged)

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
Esculin hydrolysis	+	-	+
Voges-Proskauer reaction	+	+	-
Pyrazinaminase activity	+	-	+
Arabinose fermentation	V	-	+
Mannitol fermentation	+	+	+
Sucrose fermentation	+	+	+
Ampicillin susceptibility	R	R	R
Carbenicillin susceptibility	R	R	R
Cephalothin susceptibility	R	S	R
Colistin susceptibility	V	S	S
Lysine decarboxylase	+	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Arbutin hydrolysis	+	-	+
Indole production	+	+	+
H ₂ S production	+	+	-
Gas from glucose	+	+	-
Hemolysis (TSA with 5% sheep erythrocytes)	+	+	V

+ = ให้ผลบวกมากกว่า 70%, - = ให้ผลลบหรือให้ผลบวกน้อยกว่า 30%, V = มีความแปรผัน, R = มีความต้านทาน, S = มีความไว

เมื่อพบวัฏที่อุณหภูมิต่ำ RS medium ให้ผลถูกต้องประมาณ 94% ในการแยก *A. hydrophila* เนื่องจากไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Citrobacter* ซึ่งมีความผันแปรในการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S-variable) ได้ (Shotts; & Rimler. 1973: 550-553)

1.2 การแพร่ระบาด (Outbreak)

Aeromonas มักพบมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ส่วนใหญ่พบในแหล่งน้ำจืด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งน้ำที่มีปริมาณอินทรีย์สารมาก น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน น้ำกร่อยที่มีความเค็มไม่เกิน 10% นอกจากนี้ยังพบในดินด้วย การแพร่กระจายโดยติดไปกับขนของนก สัตว์บก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์เลื้อยคลานจากสถานที่หนึ่งไปยังอีกสถานที่หนึ่ง การระบาดของโรคที่เกิดจากพวก motile aeromonad นั้นมีความเกี่ยวข้องกับความเครียดเป็นอย่างมาก ปกติพบ *A. hydrophila* ในแหล่งน้ำทั่วๆ ไปและลำไส้ของปลาปกติ หากแหล่งน้ำนั้นอยู่ในสภาวะสมดุล เชื้อแบคทีเรียนี้จะไม่ทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับปลา แต่เมื่อใดก็ตามที่มีสาเหตุทำให้สภาวะสมดุลเปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ เชื้อโรคเพิ่มปริมาณขึ้น หรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่ดี เช่น มีมลพิษสูง น้ำเน่าเสีย เป็นต้น ทำให้ปลาเกิดความเครียด โอกาสที่ปลาจะเป็นโรคก็มีมากขึ้น สภาพแวดล้อมที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ ในเขตหนาวปลาที่มี *A. hydrophila* อยู่ในตัว จะไม่เป็นโรคเมื่อเลี้ยงในน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7-8 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของน้ำที่ต่ำลงเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลากินอาหารน้อยลง การสร้างภูมิคุ้มกันอยู่ในระดับต่ำ อัตราการตายของปลาน้อย แต่โรคจะระบาดเมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นเกิน 12-14 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่การสร้างภูมิคุ้มกันของปลาเพิ่มอย่างช้าๆ แต่ไม่ได้สัดส่วนกับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย เป็นสาเหตุทำให้ปลาทาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปลาเครียดและมีเชื้อปริมาณมากในน้ำอัตราการตายก็จะเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ได้แก่ ปลาเกิดความบอบช้ำจากการขนส่ง มีบาดแผลที่ผิวหนังหรือเหงือกถูกทำลายเนื่องจากปรสิต คุณสมบัติของน้ำไม่เหมาะสม เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำเกินไปเป็นเวลานานๆ ปริมาณแอมโมเนีย (NH_3^+) ในน้ำมีมากเกินไป การปนเปื้อนของมลพิษ การเลี้ยงปลาหนาแน่นเกินไปทำให้มีของเสียขับถ่ายออกมาปริมาณมาก การให้อาหารมากเกินไปจนเหลือตกค้างในบ่อหรือกระชัง ซึ่งสาเหตุต่างๆ เหล่านี้ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดน้อยลง และจะเป็นสาเหตุโน้มนำให้ปลาอ่อนแอและเครียด เปิดโอกาสให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปทำอันตรายได้ (ชโล ลิมสุวรรณ. 2528: 28-35)

การแพร่ระบาดของเชื้อในกลุ่ม motile aeromonad นั้น พบว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคแผลเน่าเปื่อย (ulcerative disease) ในปลาจำพวกปลาดุก (*Clarias*) ที่รัฐ Java ในประเทศอินโดนีเซีย ในปี ค.ศ.1980 ซึ่งทำให้ปลาทายเป็นจำนวนมาก (Angka; Lam; & Sin. 1995: 103-112) นอกจากนี้ประเทศอินโดนีเซียแล้วยังพบการระบาดของโรคแผลเน่าเปื่อยและการตายของปลาจำนวนมากอีกหลายประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ruangpan; Kitao; & Yoshida. 1986: 345-350; Areerat. 1987: 355-362; Llobrera; & Gacutan. 1987: 273-278; Angka; Wongkar; & Karwani. 1988: 129-137; Roberts; Frerichs; & Miller. 1992: 431-436) ได้มีรายงานการสำรวจประชากรกบและลูกอ๊อด (*Rana pipiens*) ในรัฐมินนิโซตา ประเทศสหรัฐอเมริกา และบริเวณใกล้เคียง เพื่อศึกษารูปแบบการปรากฏของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการลดลงของจำนวนประชากรกบ โดยแยกเชื้อจากลำไส้เล็กของกบ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงและตรวจโดยวิธีทางชีวเคมี ซึ่ง

จากการทดลองพบ *A. hydrophila* 45.9% จากตัวอย่างกบ 222 ตัว และพบแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae อีก 29 สปีชีส์ (Hird; et al. 1983: 1423-1425) ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีรายงานการแยกเชื้อจากปอดและม้ามของแมวน้ำสีเทา (*Halichoerus grypus*) ที่อาศัยอยู่ในทะเลบอลติก (Baltic Sea) ประเทศสวีเดน ที่ตายจากอาการปอดอักเสบ เป็นหนอง และมีแผลขนาดใหญ่ที่ผิวหนัง ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าแมวน้ำในบริเวณยุโรปตอนเหนือที่ตายด้วยอาการนี้มักเกิดจาก morbillivirus โดยคาดว่าอาการตายของแมวน้ำอาจเกิดจากการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย จึงนำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการทำพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ต่อ aerolysin gene พบว่าทุกไอโซเลตที่แยกได้เป็น *A. hydrophila* (Krovacek; et al. 1998: 43-49) ส่วนในอาหารได้มีการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในอาหารทะเลตามตลาดค้าปลา ที่บริเวณ Dardanelles ของประเทศตุรกี พบว่าอาหารทะเล 84 ตัวอย่าง จาก 127 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* และ *Aeromonas* โดยพบ *V. alginolyticus* 26.7%, *V. vulnificus* 9.4%, *V. parahaemolyticus* 0.8% และ *A. hydrophila* 29.1% (Colakoglu; Sarmasik; & Koseoglu. 2006: 648-652)

1.3 การก่อโรค (Pathogenicity)

เนื่องจาก *A. hydrophila* เป็นการติดเชื้อในทุกระบบ (systemic infection) ของตัวปลา เชื้อแบคทีเรียมักเข้าทางปาก หรือเมื่อผิวหนังหรือเหงือกถูกทำลายเชื้อนี้ก็สามารถเข้าไปได้เช่นกัน และเชื้อจะเพิ่มจำนวนในลำไส้และบริเวณที่ติดเชื้อ จากนั้นจึงแพร่กระจายตามกระแสเลือดไปทั่วตัว ปลาคาร์พที่เป็นโรคติดเชื้อนี้ แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในทางเดินอาหารและหลอดเลือด แล้วแพร่ไปทั่วทุกเนื้อเยื่อที่มีเลือดไปหล่อเลี้ยง หลังจากนั้นผนังหลอดเลือดจะถูกทำลาย เกิดการตกเลือด พลาสมาไหลซึมออกมาสะสมระหว่างเซลล์ได้เกิด ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นบวมน้ำ (edema) เกิดตัวจึงพองออกมา ซึ่งโรคที่เกิดจาก *A. hydrophila* พบการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ความรุนแรงของเชื้อจึงต่างกันตามแหล่งที่อยู่ และสามารถเกิดกับสัตว์ได้หลายชนิด จึงมีชื่อพ้องอีกหลายชื่อสำหรับโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ โดยเรียกตามอาการของปลาหรือสัตว์ที่ป่วย ได้แก่ haemorrhagic septicemia ทำให้ปลาป่วยมีอาการตกเลือด เกิดกับปลาเขตร้อนทั่วๆ ไป เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*) เรียกว่าโรค red sore disease เกิดการตกเลือดในปลา pike (*Esox lucius*) เรียกว่าโรค red mouth disease มีการตกเลือดรอบปากในปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) เรียกว่าโรค red pest บริเวณด้านท้องของปลามักมีสีแดงและเลือดคั่ง (dermal hyperemia) เรียกว่าโรค rubella เกิดกับปลาคาร์พในยุโรปตะวันตก ปลามีอาการท้องมาน (ascites) และเชื้อแพร่ไปตามกระแสเลือด เรียกว่าโรค freshwater eel disease พบในปลาไหล ตกเลือดเป็นจุดเล็กๆ บริเวณท้อง เรียกว่าโรค red leg disease พบการตกเลือดในกบ (ชโล ลิมสุวรรณ. 2528: 28-36) นอกจากจะพบ *A. hydrophila* ในปลาแล้ว ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้ในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ เช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus indicus*) กุ้งกุลาลาย (*Penaeus semisulcatus*) (Vivekanandhan;

Hatha; & Lakshmanaperumalsamy. 2005: 133-137) หอยนางรม (G.J. Tsai; F.C. Tsai; & Kong. 1997: 111-116) สัตว์เลื้อยคลาน เช่น เต่า (Pasquale; et al. 1994: 1678-1680) สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ (*Rana pipiens*) (Hird; et al. 1983: 1423-1425) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น แมวน้ำสีเทา (*Halichoerus grypus*) (Krovacek; et al. 1998: 43-49) สุนัข (Ghenghesh; et al. 1999: 175-179) ซึ่งรวมไปถึงมนุษย์ด้วย โดยการเกิดโรคในมนุษย์จาก *A. hydrophila* นั้น ได้มีรายงานการเกิดโรคและอาการหลายชนิด เช่น ภาวะพิษอาหารและลำไส้อักเสบ ท้องร่วง (Pitarangsi; et al. 1982: 666-673; Aslani; & Hamzeh. 2004: 199-203) แผลติดเชื้อ เยื่อหุ้มสมอง และไขสันหลังอักเสบ ภาวะที่เลือดมีแบคทีเรีย หลอดลมอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ และ เยื่อช่องท้องอักเสบ เป็นต้น ซึ่ง *A. hydrophila* จัดเป็นเชื้อที่ฉวยโอกาสติดเชื้อในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันอ่อนแอ หรือเป็นโรคอื่นมาก่อนอยู่แล้ว (Janda; & Abbott. 1996: 151-174; 1998: 332-341; Lai; et al. 2007: 255-257)

1.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค (Virulence Factors)

เมื่อแบคทีเรียแพร่กระจายไปยังสัตว์ที่ไวต่อการรับเชื้อแล้ว แบคทีเรียนั้นต้องมีความสามารถในการเกาะติดและคงอยู่ (adhere and colonize) กับผู้ถูกอาศัยหรือโฮสต์ (host) โดยแบคทีเรียจะต้องมีคุณสมบัติพิเศษสามารถสร้างสารที่ทำให้เกาะติดและคงอยู่กับเซลล์ผู้ถูกอาศัยได้ (adherence factor) เช่น พิลไล (pili) และ แอดฮีซิน (adhesins) เป็นต้น ซึ่ง adherence factor จะไปยึดจับกับตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะของเซลล์ผู้ถูกอาศัย เมื่อมีการยึดเกาะกับผิวเซลล์แล้วแบคทีเรียต้องมีความสามารถในการแทรกแซงเข้าสู่เนื้อเยื่อของผู้ถูกอาศัย เช่น การทำให้ผิวเซลล์ของผู้ถูกอาศัยฉีกขาด ทำลายชั้นผนังของลำไส้ เป็นต้น ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียมีการสร้างสารพิษออกมา ทำลายการควบคุมระบบต่างๆ ของเซลล์ผู้ถูกอาศัย ในบางครั้งสภาพของผู้ถูกอาศัยเองก็เปิดโอกาสให้แบคทีเรียเข้าสู่ตัวได้ เช่น มีรอยถลอก หรือมีบาดแผล เป็นต้น เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ตัวของผู้ถูกอาศัยได้แล้วก็จะแทรกแซงไปยังเนื้อเยื่อส่วนที่ลึกลงไป เข้าสู่หลอดน้ำเหลืองขนาดเล็กที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ ไปยังท่อทางเดินน้ำเหลือง เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต แล้วกระจายไปยังระบบต่างๆ ทั่วร่างกาย แล้วสร้างสารพิษออกมา ทำให้เกิดพยาธิสภาพขึ้น (จุฬามาต เทพชัยศรี. 2542: 3.56-3.57)

A. hydrophila เมื่อเข้าสู่ตัวของผู้ถูกอาศัย จะมีการสร้างสารจำพวก adhesins และ lectins เพื่อยึดเกาะกับเนื้อเยื่อผิว (Chopra; & Houston. 1999: 1129-1137) แล้วสร้างสารพิษต่างๆ ออกมา ซึ่งสารพิษที่ *A. hydrophila* สร้างนั้น ได้แก่ exotoxins ซึ่งเป็นสารพิษที่แบคทีเรียสร้างและขับออกมานอกเซลล์ (extracellular products) เช่น beta-haemolysin หรือ aerolysin (Ørmen; et al. 2003: 189-196) เป็นสารที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก โดย beta-haemolysin นี้จะแทรกเข้าไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรู และสูญเสียความสามารถในการควบคุมให้สารผ่านเข้า-ออกเซลล์ (permeability) ทำให้เซลล์แตกและตาย (Howard; & Buckley. 1985: 336-340)

โดยสามารถตรวจหาสารพิษนี้ได้จากการปรากฏของวงใส (haemolysis zone) รอบโคโลนีแบคทีเรียที่เลี้ยงใน blood agar (Burke; et al. 1981: 753-761) สาร cytotoxins เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ต่างๆ ของร่างกายและทำให้เซลล์นั้นๆ ตายได้ สาร enterotoxins เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหารและลำไส้ทำให้เกิดอาการท้องเสีย สาร leukocidins จะไปทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ถูกอาศัย ทำให้ภูมิคุ้มกันของผู้ถูกอาศัยต่ำลง (จุฬามาศ เทพชัยศรี. 2542: 3.57; Chopra; & Houston. 1999: 1129-1137; Shao; Liu; & Xiang. 2004: 11-23) เอนไซม์ต่างๆ เช่น proteases, amylases, lipases/phospholipases (Shao; Liu; & Xiang. 2004: 11-23) และ endotoxins เป็นส่วนประกอบที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรีย สารที่สำคัญในเยื่อหุ้มชั้นนอกคือ lipopolysaccharide (LPS) LPS เป็นสารที่มีเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น มีความสำคัญทั้งทางในด้านโครงสร้างและหน้าที่ เพราะเป็นส่วนประกอบของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ที่เรียกว่า O antigen ส่วนที่เป็นไขมันใน LPS เรียกว่า lipid A มีสมบัติเป็น endotoxins LPS จึงมีความสำคัญในการทำให้เกิดโรค ซึ่ง endotoxin จะออกจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ก็ต่อเมื่อเซลล์แตกสลาย เมื่อเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลายในร่างกาย ทำให้ lipid A ออกจากผนังเซลล์ผู้ป่วยจะเกิดอาการไข้ ปวดเมื่อยตามตัว ท้องร่วง อ่อนเพลีย ช็อค อาการรุนแรงถึงตายได้ (จุฬามาศ เทพชัยศรี. 2542: 3.59; นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547: 58-59)

1.5 การรักษา และการควบคุมโรค (Treatment and Control)

การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคติดเชื้อ motile aeromonads โดยทั่วไปใช้

1.5.1 Oxytetracyclin (Terramycin)

ผสม oxytetracyclin ในอาหารปริมาณ 50-75 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ต่อวัน ให้ปลากินติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2528: 40; ปภาศิริ ศรีโสภารณ์. 2538: 116; Cipriano; et al. 2001: unpagged)

1.5.2 Chloramphenicol (Chloromycetin)

ผสม chloramphenicol ในอาหารในอัตราเดียวกันกับ oxytetracyclin คือใช้ chloramphenicol 50-75 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ต่อวัน ให้ปลากินติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2528: 40) และใช้ปริมาณ 3-5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 100 กรัม ต่อวัน ในการรักษาที่เป็นโรค red leg disease จากการติดเชื้อ motile aeromonads ให้กินวันละ 2 ครั้ง กินติดต่อกันนาน 5 วัน (ปภาศิริ ศรีโสภารณ์. 2538: 115; Cipriano; et al. 2001: unpagged)

1.5.3 Sulfamerazine

ผสม sulfamerazine ในอาหารปริมาณ 264 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ต่อวัน ให้ปลากินเป็นเวลา 3 วัน ตามด้วย 154 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ต่อวัน กินติดต่อกันอีก 11 วัน มักให้ผลในการรักษาดี (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2528: 40)

1.5.4 Furanace

Furanace มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อ motile aeromonads หากนำปลาไปแช่ในน้ำที่ผสม furanace 1-2 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 5-10 นาที หรือเลี้ยงปลาในน้ำที่ผสม furanace 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร นาน 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม furanace นี้จะมีความเป็นพิษต่อปลาหากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม จึงมีการห้ามใช้ furanace ในการรักษาปลาที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Mitchell; & Plumb. 1980: 93-99)

อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาสัตว์น้ำหรือผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *A. hydrophila* หากมีการศึกษาความไวของเชื้อนี้ต่อยาปฏิชีวนะมาก่อน จะช่วยให้เลือกใช้ยาได้ถูกต้องมากขึ้น การรักษาก็จะได้ผลดีมากขึ้นตามไปด้วย ดังรายงานต่างๆ นี้

ได้มีการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *A. hydrophila* พบว่าเชื้อนี้มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol, Neomycin, Sulfamethoxazole, Streptomycin และ Trimethoprim/sulfamethoxazole (Krovacek; et al. 1989: 149-154) ต่อมาได้มีการศึกษาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *A. hydrophila* จากสิ่งปลูกุลในบริเวณต่างๆ ของรัฐจอร์เจียเหนือ พบว่าทุกไอโซเลตของ *A. hydrophila* มีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Ampicillin, Bacitracin, Penicillin, Tetracycline และ Streptomycin และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Erythromycin, Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid และ Neomycin (Kelley; et al. 1998: 243-247) ในปีถัดมามีการศึกษาความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *A. hydrophila* 80 ไอโซเลต ที่แยกได้จากปลา channel catfish 238 ตัว พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Chlorotetracyclin, Oxytetracyclin, Chloramphenicol, Trimethoprim/sulfamethoxazole, neomycin และ Tetracycline (Wang; & Silva. 1999: 30-34) ซึ่งผลการศึกษาต่างๆ นี้ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความไวและความต้านทานของเชื้อต่อยาชนิดต่างๆ ดังนั้นการรักษาการติดเชื้อจาก *A. hydrophila* จึงต้องใช้ยาปฏิชีวนะให้ถูกต้องเหมาะสม และถูกวิธีไม่ว่าผู้ใช้นั้นจะเป็นบุคลากรทางการแพทย์ แพทย์ หรือเกษตรกร ก็ตาม มิฉะนั้นจะพบว่าความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ จะลดลง และเชื้อจะดื้อยา ซึ่งจะเป็นปัญหาต่อไปเกี่ยวกับการรักษาโรค และการควบคุมโรค

1.6 วิธีการตรวจวิเคราะห์

ในอดีตได้มีรายงานการพัฒนาวิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หา *A. hydrophila* ขึ้นมาหลายวิธีทั้งวิธีแบบดั้งเดิม โดยการสังเกตดูลักษณะโคโลนี แล้วย้อมสีแกรมพร้อมทั้งดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ หรือจากการพัฒนาใช้ differential medium ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะและสารเคมีต่างๆ เช่น โนโวไบโอซิน และโซเดียมดีออกซีโคเลต ลงไปด้วย เพื่อเป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียในจินัส *Vibrio* (Shotts; & Rimler. 1973: 550-553) อีกทั้งยังสามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อใช้พิสูจน์ทราบว่าเป็น *A. hydrophila* (Vivekanandhan; Hatha; & Lakshmanaperumalsamy. 2005: 133-137)

ซึ่งลักษณะทางชีวเคมีของ *A. hydrophila* ได้แสดงไว้ในตาราง 1 ส่วนการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางโมเลกุล (Molecular method) มีการใช้เทคนิค PCR ในการพิสูจน์ทราบเชื้อชนิดนี้ด้วย ดังรายงานในปี 1995 ซึ่งมีการใช้วิธี PCR ในการตรวจหา aerolysin gene (*aer*) ในแบคทีเรียจีแนส *Aeromonas* จากตัวอย่างน้ำดื่ม ปลา และอาหาร โดย primer ที่ใช้มีความจำเพาะกับ *aer* gene และให้ผลผลิต PCR ขนาด 209 คู่เบส พบว่าสามารถใช้ primer คู่นี้ในการตรวจหา *A. hydrophila* ไอโซเลตที่มีการสร้าง aerolysin ส่วนมากได้ (48 ไอโซเลต จากทั้งหมด 52 ไอโซเลต) (Baloda; et al. 1995: 17-26) ในปีต่อมา มีรายงานการใช้วิธี PCR ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *A. hydrophila* Hybridization group 1 (HG1) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับ *lip* gene ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการแปลรหัสไปเป็นเอนไซม์ thermostable extracellular lipase ของ *A. hydrophila* และให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 760 คู่เบส พบว่า *A. hydrophila* ทุกไอโซเลตใน HG1 ที่ใช้ในการทดสอบนั้น มีการสร้างผลิตภัณฑ์ PCR โดยที่ HG กลุ่มอื่นไม่มีการสร้างผลผลิต PCR ขึ้นมา ทำให้สามารถใช้ primer คู่นี้ในการจำแนก *A. hydrophila* HG1 ออกจาก HG อื่นได้ อีกทั้งยังมีความไวสูง สามารถใช้ทำ PCR ได้ผลดี แม้มีปริมาณแบคทีเรียเพียง 10 CFU/ml. หรือมีปริมาณดีเอ็นเอเพียง 0.89 พิโคกรัม ก็ตาม (Cascón; et al. 1996: 1167-1170) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธี Multiplex PCR ในการตรวจหา hemolysin genes ของ *A. hydrophila* และ *A. sobria* โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ *ahh1* (*A. hydrophila* extracellular hemolysin gene), *aerA* (*A. hydrophila* aerolysin gene) และ *asa1* (*A. sobria* hemolysin gene) ซึ่ง *A. hydrophila* ทั้งหมด 87 ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (100%) ทั้งกลุ่มที่มีลักษณะทางฟิโนไทป์ในการย่อยเม็ดเลือดและไม่ย่อยเม็ดเลือด ให้ผลบวกในการทำ PCR ต่อ *ahh1* gene และมี *A. sobria* 2 จาก 21 ไอโซเลต *A. caviae* 3 จาก 15 ไอโซเลต *A. trota* 2 จาก 2 ไอโซเลต และ *A. jandaei* 1 จาก 1 ไอโซเลต ให้ผลบวกต่อ *ahh1* gene ด้วยเช่นกัน (Wang; et al. 2003: 1048-1054)

2. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมักมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์ (B-lymphocytes หรือ B-cells) จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบ

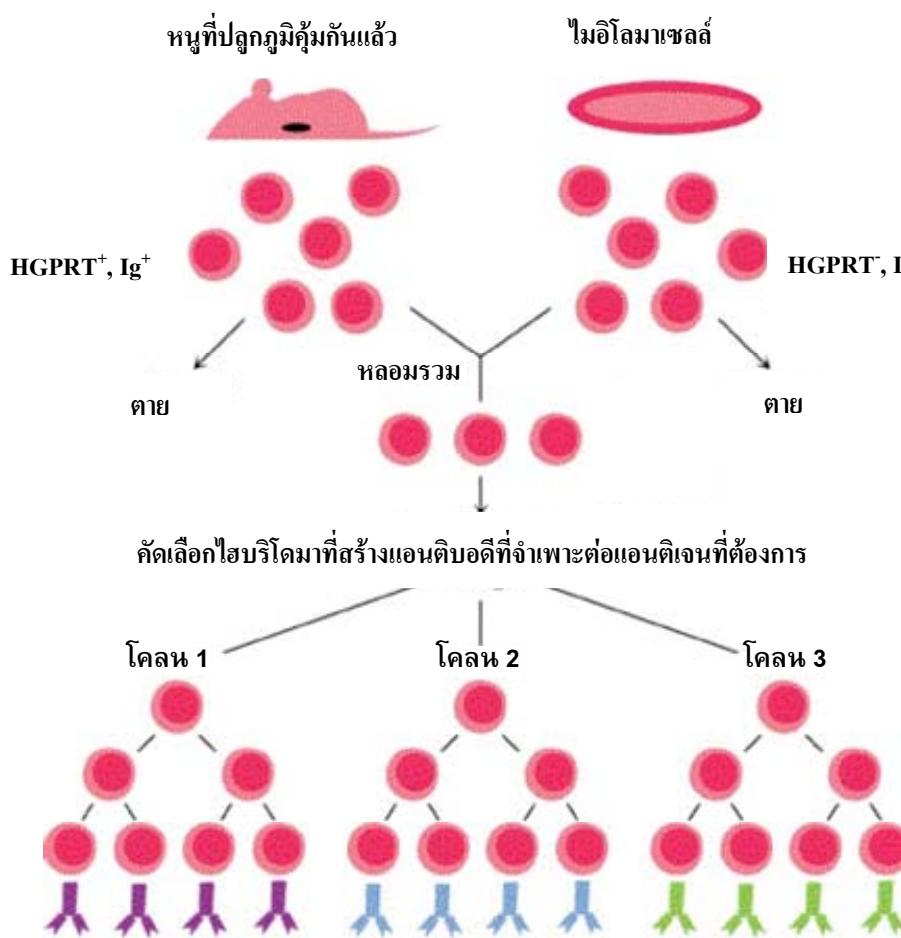
ต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากหนึ่งโคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-91)

2.1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้ถูกคิดค้นเป็นผลสำเร็จโดย Köhler และ Milstein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการนำบี-เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากคุณสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดคือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่มีอายุจำกัด และไมอีโลมาเซลล์ซึ่งไม่ผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวได้ตลอด ให้คุณสมบัติในการเจริญเติบโตได้โดยไม่มีขีดจำกัด ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมาก และแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุด ดังภาพประกอบ 1 เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพสูงและนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ อย่างกว้างขวาง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91)

2.2 การสร้างและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากที่มีการหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีโดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด แต่จะมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ การใช้ไมอีโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในกระบวนการ salvage pathway คือมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) อะมิโนปเทอริน (aminopterin) และไทมิดีน (thymidine) หรือ HAT medium ซึ่งเมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมอีโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway จากบี-เซลล์ ส่วนบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 91)



ภาพประกอบ 1 หลักการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี somatic hybridization
(ดัดแปลงจาก http://www2.hawaii.edu/.../Chap5_Ag_Ab_reactions.htm)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 กระบวนการ คือ de novo pathway และ salvage pathway (ภาพประกอบ 2) ในกรณีของ de novo pathway จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่เมทิล (methyl) หรือฟอร์มิล (formyl) จาก tetrahydrofolate ซึ่งการย้ายหมู่ methyl หรือ formyl นี้สามารถถูกยับยั้งด้วย aminopterin ดังนั้นเมื่อ de novo pathway ถูกยับยั้งเซลล์ก็จะเปลี่ยนมาใช้ salvage pathway โดยการเปลี่ยนพิวรีน (purine) หรือ ไพริมิดีน (pyrimidine) เป็นนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแทน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องใน salvage pathway นั้นได้แก่เอนไซม์ HGPRT และเอนไซม์ thymidine kinase (TK) ความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใน salvage pathway ได้ ดังนั้น aminopterin ที่มีอยู่ใน HAT medium จะไปขัดขวาง de novo pathway ส่วน hypoxanthine และ thymidine จะทำให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยใช้ salvage pathway ดังนั้นเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์

ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (2) ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทาง การแพทย์ในการวินิจฉัย การตรวจ และการใช้รักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่างๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้า กันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548: 95-97)

2.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรค

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีรายงานถึงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ เชื้อที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ เช่น ไวรัสที่ก่อโรคในกุ้ง ได้แก่ Monodon Baculovirus (MBV) (Boonsanongchokying; et al. 2006), White Spot Syndrome Virus (WSSV) (Makesh; et al. 2006), Hepatopancreatic parvovirus (HPV) (Rukpratanporn; et al. 2005), Yellow Head Virus (YHV) (Sithigorngul; et al. 2002) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเปปไทด์ฮอร์โมนจากก้านตา (Panchan; et al. 2005) และเม็ดเลือด (Winotaphan; et al. 2005) ของกุ้งกุลาดำ อีกทั้งยังมีการ ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์อีกมาก เช่น การผลิตโมโน โคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในจลินัส *Vibrio* สปีชีส์ต่างๆ เช่น *V. parahaemolyticus* (Honda; et al. 1989: 245-253), *V. cholera* (Takeda; et al. 1990: 2755-2759), *V. harveyi* (Phianphak; et al. 2005: 16-168), *V. vulnificus* (Pusiririt; et.al. 2005: 114-118), *V. alginolyticus* (Sithigorngul; et al. 2006: 71-76) และ *Vibrio* spp. (Chen; et al. 1992: 3694-3700) เป็นต้น โดยใช้แอนติเจนใน การปลูกภูมิคุ้มกันสัตว์ทดลองหลายรูปแบบ เช่น การใช้ thermostable direct hemolysin, heat stable enterotoxin และแบคทีเรียทั้งเซลล์ เป็นต้น ซึ่งวิธีที่มักใช้ในการคัดเลือกและพิสูจน์ เอกลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ คือวิธี ELISA, dot blotting และ Western blotting นอกจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียในจลินัส *Vibrio* แล้ว ยังมีการผลิตโมโน โคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดอื่นอีก เช่น *Escherichia coli* (He; et al. 1996: 3325-3332), *Campylobacter jejuni* (Lu; et al. 1997: 87-91), *Bacillus cereus* (Charni; et al. 2000: 2278-2281), *Photobacterium damsela piscicida* (Jung; et al. 2001: 67-77) และ *Bifidobacterium* spp. (Amrouche; et al. 2006:159-170) เป็นต้น (ตาราง 3)

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. hydrophila* ก็มีผู้ที่ได้ศึกษาไว้ดังนี้คือ มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ATCC 7966 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ ในการปลูกภูมิคุ้มกัน คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี ELISA ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี 5F3 ที่มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ แต่มี ความจำเพาะอย่างสูงกับ *A. hydrophila* 2 ไอโซเลตเท่านั้น คือ ATCC 7966 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ใช้ใน การปลูกภูมิคุ้มกัน และ CECT 398 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดีนี้สามารถจับกับแถบโปรตีนของ *A. hydrophila* ATCC 7966 ได้ที่น้ำหนักโมเลกุล 110

ตาราง 3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (ดัดแปลงจาก อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. 2548: 18)

แบคทีเรีย	แอนติเจนที่ใช้	วิธีที่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์	เอกสารอ้างอิง
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	thermostable direct hemolysin	ELISA	Honda; et al. 1989
<i>V. cholerae</i>	heat stable enterotoxin	ELISA, amino acid sequence	Takeda; et al. 1990
<i>Vibrio</i> spp.	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Chen; et al. 1992
<i>V. harveyi</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	dot blotting, WB, IHC	Phianphak; et al. 2005
<i>V. vulnificus</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	dot blotting, WB, IHC	Pusiririt; et.al. 2005
<i>V. alginolyticus</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	dot blotting, WB, IHC	Sithigorngul; et al. 2006
<i>Escherichia coli</i>	แฟลกเจลลา	ELISA, WB	He; et al. 1996
<i>Campylobacter jejuni</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Lu; et al. 1997
<i>Bacillus cereus</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB	Charni; et al. 2000
<i>Photobacterium damsela piscicida</i>	แบคทีเรียทั้งเซลล์	ELISA, WB, IHC	Jung; et al. 2001
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Cell wall proteins	ELISA, WB	Amrouche; et al. 2006

IHC = Immunohistochemistry,

WB = Western blotting,

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

กิโลดาลตัน และสามารถใช้ตรวจจับ *A. hydrophila* ความเข้มข้นต่ำได้ถึง 10^5 cell/ml โมโนโคลนอลแอนติบอดี 5F3 นี้ ยังแสดงปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ *A. sobria* และ *A. caviae* ด้วย เมื่อแบคทีเรียมีความเข้มข้นสูงกว่า 10^8 cell/ml นอกจากนี้ยังนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้ไปตรวจการติดเชื้อในตัวอย่างอุจจาระ และเลือด ของมนุษย์และสัตว์เลือดเย็นได้ (Delamare; et al. 2002: 936-940)

ในปีเดียวกันได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. hydrophila* 94030 โดยใช้ *A. hydrophila* 94030 ทั้งเซลล์ในรูปแบบที่ถูกทำให้ตายด้วยความร้อน เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันหนู หลังจากผลิตเซลล์ไฮบริโดมาแล้ว ได้คัดเลือกเซลล์ด้วยวิธี ELISA และ Western blotting ซึ่งได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 8D10 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะอย่างสูงต่อ *A. hydrophila* 94030 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน และไอโซเลต 95014 เมื่อ

เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับ *A. hydrophila* 95014 และแอนติบอดีกับ *A. hydrophila* 94030 พบว่าแอนติบอดี 8D10 นี้ สามารถทำปฏิกิริยากับ *A. hydrophila* 95014 ได้ 89.9% เมื่อเทียบกับการทำปฏิกิริยากับ *A. hydrophila* 94030 (100%) ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ยังทำปฏิกิริยาอย่างอ่อนกับ *A. hydrophila* อื่นอีก 16 ไอโซเลต จาก 25 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของ *A. hydrophila* ทั้งสองไอโซเลตที่ทำปฏิกิริยาอย่างสูงคือ ไอโซเลต 94030 และ 95014 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41 กิโลดาลตัน และจับกับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70-82 กิโลดาลตัน อย่างอ่อนๆ ของ *A. hydrophila* อื่นอีก 11 ไอโซเลตด้วย อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดี 8D10 นี้ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *A. hydrophila* (Chanphong; et al. 2002: 355-360)

นอกจากนี้ยังได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* 1234 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ในการปลูกหมักคู่กัน ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะแตกต่างกัน 3 กลุ่มคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* 1234 ซึ่งจับกับ 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* 1 ไอโซเลต โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จำเพาะต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน ซึ่งพิสูจน์โดยใช้วิธี dot blotting และ Western blotting โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 และ 2 สามารถใช้ตรวจการติด *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อ LPS ของ *A. hydrophila* ตรงบริเวณที่แตกต่างกัน ทำให้นำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. hydrophila* ได้ และสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ซึ่งจำเพาะต่อ *Aeromonas* ทุกไอโซเลตมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียในจิ้งหรีด *Aeromonas* เบื่องตันได้โดยวิธี dot blotting (Prahkarnkao; et al. 2005)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้มีดังนี้

1. หนูขาวพันธุ์ Swiss mice จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
2. ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) จากตลาดนัดจตุจักร ความยาวประมาณ 1 นิ้ว
3. แบคทีเรียไอโซเลตต่างๆ ดังตาราง 4

ตาราง 4 แบคทีเรียต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Specimen
<i>A. hydrophila</i> 1234 (AH1)	VMARC	Carp's kidney
<i>A. hydrophila</i> 04082 (AH2)	AAHRI	?
<i>A. hydrophila</i> 2798 (AH3)	DMST	?
<i>A. hydrophila</i> 22095 (AH4)	DMST	Hemo
<i>A. hydrophila</i> 22096 (AH5)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 22097 (AH6)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 22098 (AH7)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 490601 (AH8)	SWU	Gold fish
<i>A. hydrophila</i> 24057 (AH9)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 24058 (AH10)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 24059 (AH11)	DMST	Stool
<i>A. hydrophila</i> 24060 (AH12)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 12056 (AS1)	NCIMB	?
<i>A. sobria</i> 12446 (AS2)	DMST	?
<i>A. sobria</i> 22099 (AS3)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22100 (AS4)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22101 (AS5)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 22102 (AS6)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24061 (AS7)	DMST	Stool

ตาราง 4 (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Specimen
<i>A. sobria</i> 24062 (AS8)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24063 (AS9)	DMST	Stool
<i>A. sobria</i> 24064 (AS10)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 13016 (AC1)	NCIMB	Stool
<i>A. caviae</i> 22103 (AC2)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 22104 (AC3)	DMST	Rectal swab
<i>A. caviae</i> 22105 (AC4)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 22106 (AC5)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24065 (AC6)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24066 (AC7)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24067 (AC8)	DMST	Stool
<i>A. caviae</i> 24068 (AC9)	DMST	Pus
<i>A. veronii</i> 21255 (AV)	DMST	?
<i>A. jandaei</i> 21256 (AJ)	DMST	?
<i>Plesiomonas shigelloides</i> 22107	DMST	Rectal swab
<i>Ples. shigelloides</i> 22108	DMST	Rectal swab
<i>Ples. shigelloides</i> 22109	DMST	Rectal swab
<i>V. cholerae</i> 22135	DMST	Stool
<i>V. alginolyticus</i> 22082	DMST	Stool
<i>V. fluvialis</i> 22085	DMST	Rectal swab
<i>V. harveyi</i> 639	CENTEX	<i>Penaeus monodon</i>
<i>V. mimicus</i> 22088	DMST	Food
<i>V. parahaemolyticus</i> 22091	DMST	Stool
<i>V. campbellii</i> 21361	Ghent	?
<i>V. ordalii</i>	DABU	?
<i>V. penaeicida</i>	DMSC	?
<i>V. vulnificus</i> (MT1506)	DABU	?
<i>Photobacterium damsela</i> sub. <i>damsela</i>	DABU	Sea bass
<i>Photobacterium damsela</i> sub. <i>piscicida</i>	DABU	Sea bream
<i>Salmonella</i> Typhi	DMSM	?

ตาราง 4 (ต่อ)

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Specimen
<i>Salmonella</i> Enteritidis 7108	DMST	?
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CPF	?
<i>Enterobacter cloacae</i>	DMSM	?
<i>Shigella flexneri</i>	DMSM	?
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DMSM	?
<i>Proteus vulgaris</i>	DMSM	?

- DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health
- DMSC = Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
- DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University
- DABU = Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University
- VMARC = Veterinary Medical Aquatic Research Center, Chulalongkorn University
- AAHRI = Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture
- NCIMB = The National Collection of Industrial, Marine Food Bacteria, Khonkaen University
- SWU = Department of Biology, Faculty of Science, Srinakarinwirot University
- CENTEX= Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University
- CPF = Charoen Pokphand Foods Public Company Limited
- Ghent = Ghent University, Belgium
- ? = ไม่ทราบแหล่งที่แยกเชื้อ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) รุ่น 7M บริษัท Spectrafuge
2. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (Horizontal Laminar Flow Cabinets) บริษัท NUAIRE
3. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO₂ Incubator) บริษัท NUAIRE
4. ชุด transblot apparatus บริษัท Bio-Rad
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น 6400 ของบริษัท JENWAY
6. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) รุ่น RM2135 ของบริษัท LEICA

สารเคมี

1. Phosphate Buffered Saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2
2. เมอร์ไธโอเลต (merthiolate) เข้มข้น 1%
3. สารละลาย blotto เข้มข้น 5%
4. ซิตเรทบัฟเฟอร์ (citrate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5
5. กรดซัลฟูริก (H₂SO₄) เข้มข้น 1 นอร์มอล
6. น้ำยาคงสภาพ Davidson's Fixative
7. สี Eosin Y 0.2% ในเอทานอล (ethanol) เข้มข้น 95%
8. เอทานอลเข้มข้น 70%, 80%, 90% และ 95%
9. นอร์มอลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol)
10. ไชลีน (xylene)
11. ฟอर्मาลิน (formalin) เข้มข้น 10%
12. 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB)
13. O-Phenylenediamine (OPD)
14. พาราพลาสต์ (paraplast)
15. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide, H₂O₂)
16. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution)
17. ตัวกลางผนึก (permount)
18. สารละลาย P₁⁺ (calf bovine serum เข้มข้น 10%)
19. น้ำกลั่น

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *A. hydrophila* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตาราง 4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (Difco) ที่ไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรณีของแบคทีเรียในจีนัส *Vibrio* นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดเก็บเซลล์ให้อยู่ในรูปแบบสารแขวนลอยโดยใช้ 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) นำสารแขวนลอยที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารแขวนลอยเซลล์ด้วย PBS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ซึ่งจะมีแบคทีเรียประมาณ 1×10^9 CFU/ml. เพื่อใช้สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนู ส่วนแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งนำไปเก็บรักษาในอาหารเลี้ยง tryptic soy broth ที่เติมกลีเซอรอล 20% เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมแอนติเจน

นำแบคทีเรียทุกชนิดที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 1.1 มาฆ่าด้วยความร้อน (heat-killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Chanphong; et al. 2002: 355-360) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรีย *A. hydrophila* จำนวน 8 ไอโซเลต คือ *A. hydrophila* AH1, AH2, AH3, AH4, AH5, AH6, AH7 และ AH8 แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งทำแบคทีเรียให้อยู่ในรูปแบบคงสภาพ (heat-killed form) โดยผสมแบคทีเรียกับ PBS ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนสองนำมาทำให้อยู่ในรูปแบบเสียสภาพ (denatured form) โดยผสมแบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพกับ 2x treatment buffer (10% SDS และ beta-mercaptoethanol) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ส่วนที่สามนำมาทำให้อยู่ในรูปแบบที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน (formalin form) นำแบคทีเรียที่เตรียมได้ทั้ง 3 รูปแบบ มาแบ่งใส่ในหลอด microfuge แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูต่อไป

1.3 การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว (Immunization)

นำแอนติเจนที่เตรียมได้ตามวิธีการในข้อ 1.2 ทั้ง 3 รูปแบบคือ แบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพ รูปแบบเสียสภาพ และรูปแบบที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1 ต่อ 3 แล้วนำไปฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาวจำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร ฉีดกระตุ้น 3 ครั้ง ด้วยแบคทีเรียในรูปแบบคงสภาพ รูปแบบเสียสภาพ รูปแบบที่ถูกทำให้คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน และ

incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1 ต่อ 3 ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้น 1 สัปดาห์ หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 จะเก็บเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณตา (orbital sinus) ของหนู แล้วปั่นแยก ซีรัมออกจากเลือดที่แข็งตัว นำซีรัมที่ได้ไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ โดยวิธี Western blotting แล้วเลือกหนูตัวที่มีการตอบสนองดีที่สุดที่สุดมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

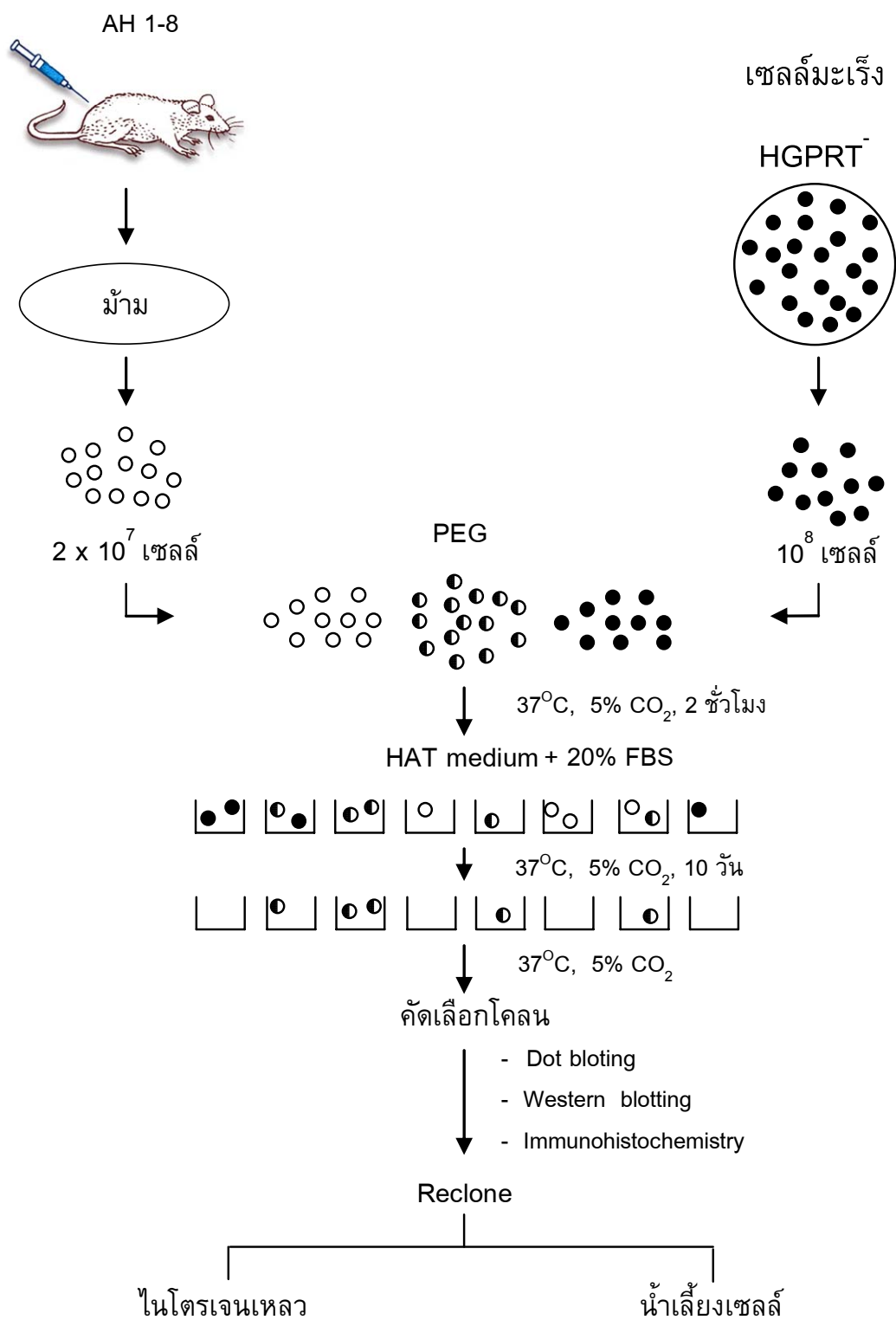
2. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดัดแปลงจากวิธีการซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein (1975) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *A. hydrophila* ตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดกระตุ้นด้วยแบคทีเรียทั้งสามรูปแบบที่ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ต่อ 1 ต่อ 3 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร อีกครั้ง ก่อนการผลิตเซลล์ลูกผสม 3 วัน จากนั้นแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG : Polyethylene glycol) เข้มข้น 40% เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI) บ่มเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นแยกเซลล์ผสม จากนั้นกระจายเซลล์ลงเลี้ยงใน 96 wells microculture plate ที่มี RPMI เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) กับ 20% fetal bovine serum (FBS) จำนวน 30 ถาด เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลาประมาณ 10 วัน คัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry นำไฮบริโดมาที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้วมาโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ โดยทดสอบด้วยวิธี dot blotting และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ แล้วจะเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิประมาณ -190 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะเก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป ดังภาพประกอบ 3

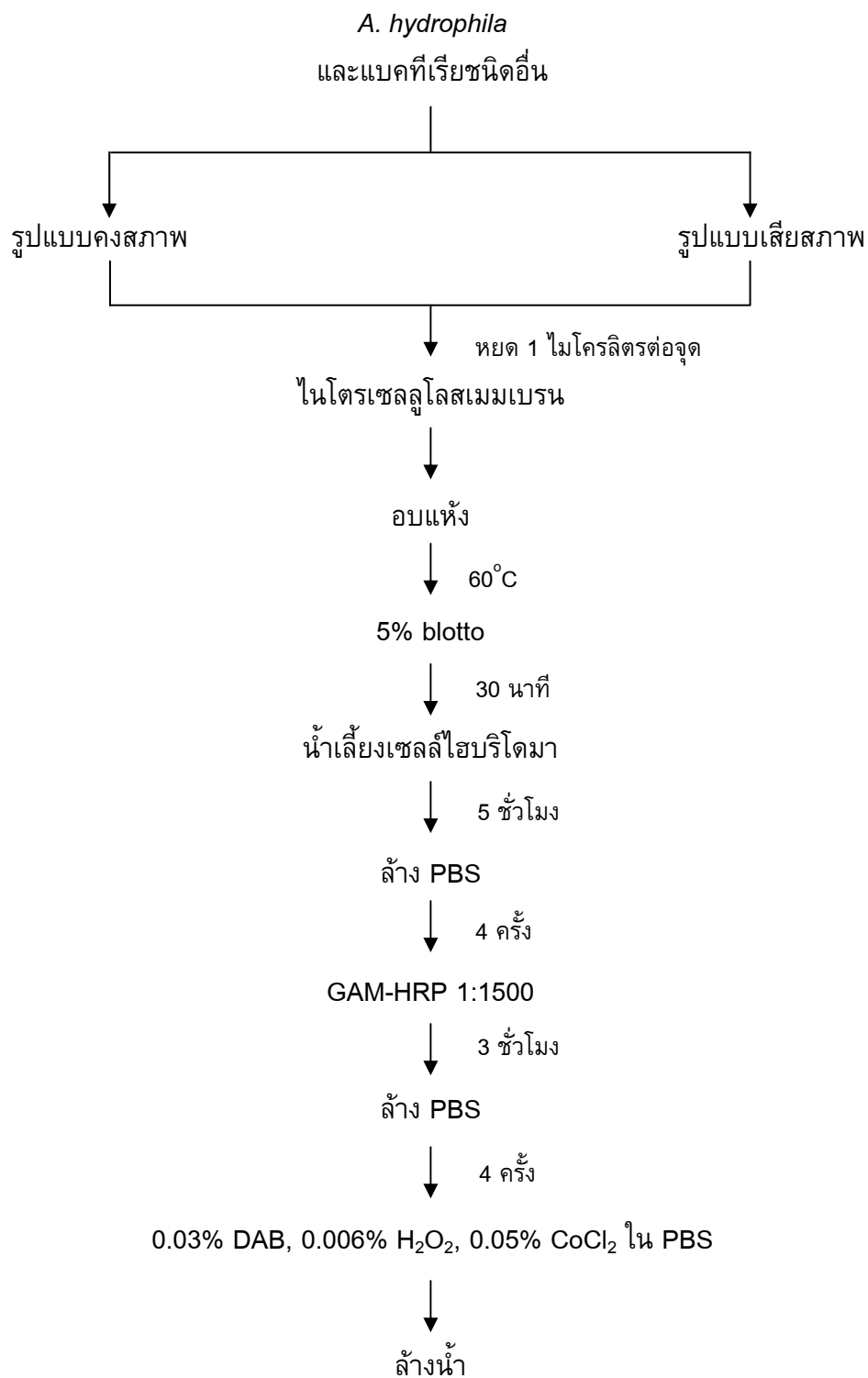
3. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

3.1 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 โดยวิธี dot blotting

นำ *A. hydrophila* ทั้งในรูปแบบคงสภาพและรูปแบบเสียสภาพ มาหยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) ประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบอุ่นให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุม เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้าง PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน Goat anti-mouse immunoglobulin (H&L) horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS ดังแสดงในภาพประกอบ 4 จากนั้นเลือกไฮบริโดมาโคลนที่ให้ผลบวก นำไปคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2



ภาพประกอบ 3 ไดอะแกรมการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี
(ดัดแปลงจากไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 94)



ภาพประกอบ 4 ไตอะแกรมการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยวิธี dot blotting

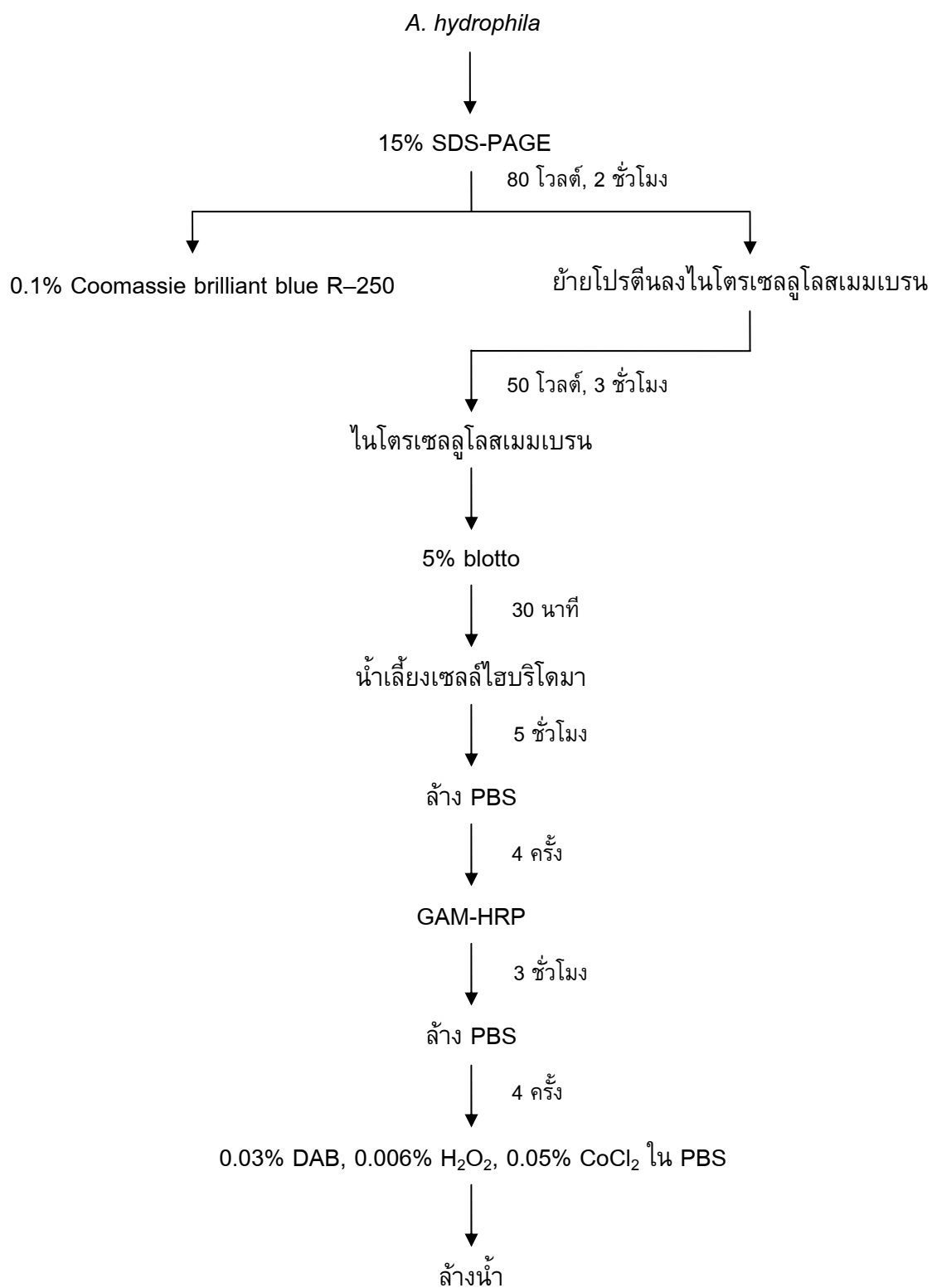
3.2 การคัดเลือกขั้นตอนที่ 2

3.2.1 การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting

นำ *A. hydrophila* ในรูปแบบเสียสภาพมาแยกบน 15% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างส่วนหนึ่งในเจลมาย้อมด้วยสี 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ผ่านกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตัดแบ่งไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS ตรวจดูแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ดังแสดงในภาพประกอบ 5

3.2.2 การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

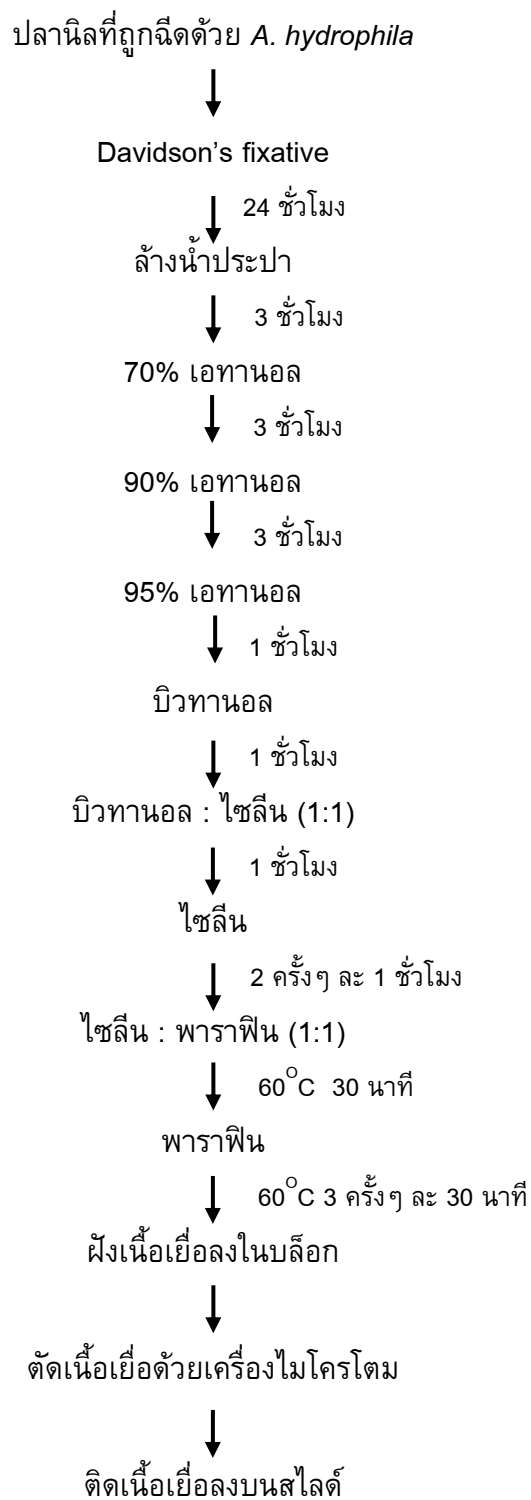
นำ *A. hydrophila* และแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังตาราง 4 ทั้งในรูปแบบคงสภาพและรูปแบบเสียสภาพ มาหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วแช่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting ในการคัดเลือกขั้นตอนที่ 1 แล้ว เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS เลือกลีไฮบริโดมาโคลนที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อ *A. hydrophila* แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่น



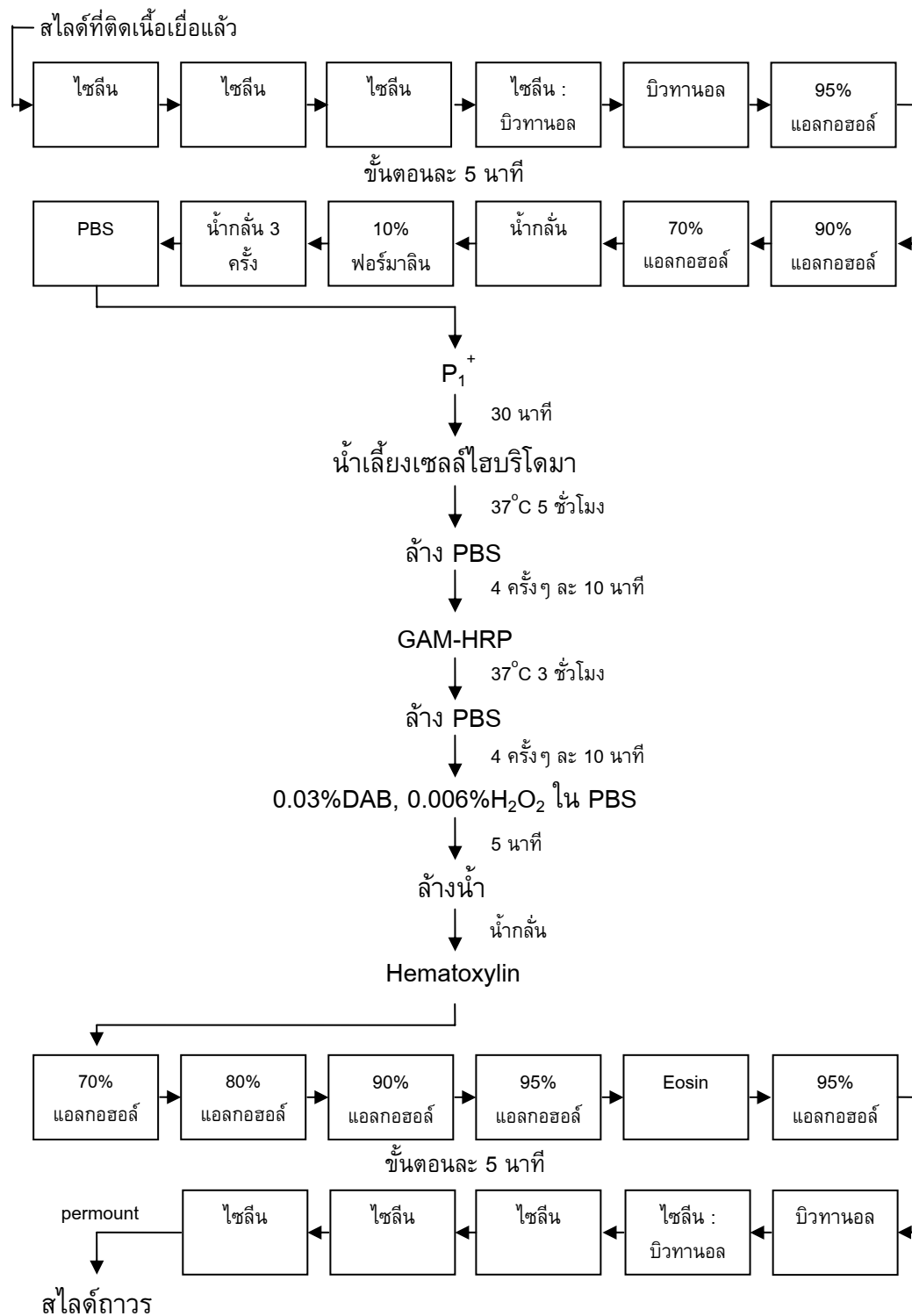
ภาพประกอบ 5 ไดอะแกรมการตรวจสอบลักษณะโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Western blotting

3.2.3 การคัดเลือกโดยวิธี immunohistochemistry

เลี้ยงปลานิลจำนวน 80 ตัว ในถังพลาสติกขนาดประมาณ 50x70x30 เซนติเมตร ที่มีการปรับสภาพน้ำให้มีความเค็ม 3 ส่วนในพันส่วน เลี้ยงถึงระยะ 10 ตัว จำนวน 8 ถึง โดยฉีด *A. hydrophila* AH1-8 เข็มข้นประมาณ 1×10^9 CFU/ml ให้กับปลานิลไอโซเลตละ 10 ตัว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ตัว เข้าตรงบริเวณกล้ามเนื้อที่ด้านหลังปลา (dorsal) เก็บตัวอย่างปลาที่ตายไปทำให้คงรูป (fix) ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ใบมีดกรีดที่กล้ามเนื้อด้านหลังตามแนวยาวของตัวปลา เพื่อให้สารละลาย Davidson's fixative แทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อปลา ได้ดีขึ้น เปลี่ยนสารละลาย Davidson's fixative อีกครั้ง แช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อปลามา ล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อชะน้ำยาคงรูปออก นำมาผ่านกระบวนการดิ่ง น้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ บิวทานอล และไซลีน ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อ มาฝังในพาราฟิน แล้วตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครทอมให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน ตัด เนื้อเยื่อลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน (ภาพประกอบ 6) อบสไลด์ให้แห้งที่ตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างพาราฟินออก (deparaffination) ด้วยไซลีน และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (rehydration) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มอลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำ กลั่น และ PBS หยดสารละลาย P_1^+ ลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำน้ำเลี้ยง เซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง หยด GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,000 ใน P_1^+ บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสม ซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้าง เนื้อเยื่อด้วยน้ำ 5 ครั้ง ย้อมด้วยสียโอซิน แล้วนำไปผ่านกระบวนการดิ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วย แอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ และไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (ภาพประกอบ 7) นำไปส่องดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล นำเซลล์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกขั้นที่ 2 มาโคลนซ้ำ (reclone) และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ เก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้เก็บไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป



ภาพประกอบ 6 ไคอะแกรมการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับตัด section



ภาพประกอบ 7 การทดสอบ immunohistochemistry (ดัดแปลงจากไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 235)

4. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังการ reclone เซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือก จะยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ได้โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 และตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนที่ขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาจำแนก class และ subclass ด้วยวิธี sandwich ELISA และตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหา *A. hydrophila* ด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีการที่อธิบายไว้ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ตรึง *A. hydrophila* เข้มข้น 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 เติมสารละลาย 5% blotto ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย 5% blotto) ลงในหลุมต่างๆ ของถาด 96 หลุม (ตาราง 5) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม GAM-HRP เจือจาง 1:1500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลายซับสเตรตซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 mg./ml., 0.006% hydrogen peroxide ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟูริก เข้มข้น 1 นอร์มอล ลงในทุกหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader

4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

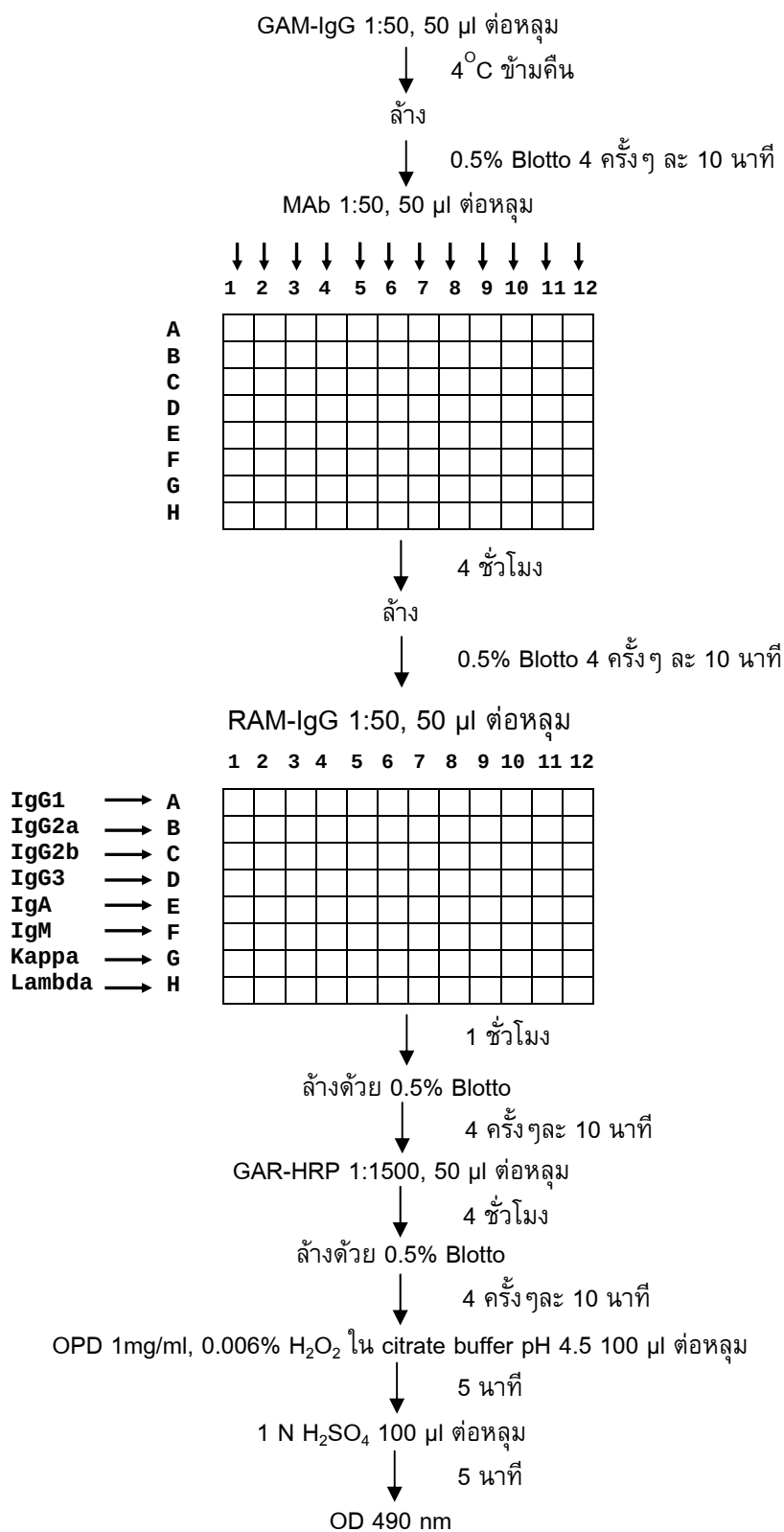
จำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างโดยโคลนต่างๆ ของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) ดังแสดงในภาพประกอบ 8

ตาราง 5 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจน (MAbs = monoclonal antibodies, AH = *A. hydrophila*)

MAbs	AH 1	AH 2	AH 3	AH 4	AH 5	AH 6	AH 7	AH 8	AH 9	AH 10	AH 11
AH 1	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6	1+7	1+8	1+9	1+10	1+11
AH 2		2+2	2+3	2+4	2+5	2+6	2+7	2+8	2+9	2+10	2+11
AH 3			3+3	3+4	3+5	3+6	3+7	3+8	3+9	3+10	3+11
AH 4				4+4	4+5	4+6	4+7	4+8	4+9	4+10	4+11
AH 5					5+5	5+6	5+7	5+8	5+9	5+10	5+11
AH 6						6+6	6+7	6+8	6+9	6+10	6+11
AH 7							7+7	7+8	7+9	7+10	7+11
AH 8								8+8	8+9	8+10	8+11
AH 9									9+9	9+10	9+11
AH 10										10+10	10+11
AH 11											11+11

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. hydrophila* โดยวิธี dot blotting

นำ *A. hydrophila* ทั้งในรูปแบบคงสภาพและเสียสภาพ เข้มข้น 10^9 CFU/ml มาทำเจือจางแบบ serial dilution ด้วย PBS แบบ ten fold dilution แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แขนในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS ตรวจดูระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า



ภาพประกอบ 8 ไตอะแกรมการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี
(ดัดแปลงจาก Winotaphan. et al. 2005: 189-198)

4.4 การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างปลาหิล

นำ *A. hydrophila* AH7 จากที่เก็บอยู่ในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มา activate ในอาหาร tryptic soy agar จากนั้นนำเชื้อมาผสมในสารละลาย PBS นำสารแขวนลอยเซลล์นี้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารแขวนลอยเซลล์ด้วย PBS ให้มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 (มีแบคทีเรียประมาณ 1×10^9 CFU/ml) นำสารแขวนลอยนี้มาเจือจางแบบ serial ten fold dilution ใน tryptic soy broth ที่มีเนื้อปลาผสมอยู่ (1:10) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^7 -1 CFU/ml โดยใช้หลอดที่ไม่ได้มีการผสมเชื้อเป็น control ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อที่บ่มดังกล่าวมาฆ่าด้วยความร้อน (heat-killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำเชื้อที่ได้ผ่านการฆ่าด้วยความร้อนมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสประมาณ 1 ไมโครลิตร/จุด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปปั่นใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปปั่นในสารละลายผสมซึ่งประกอบ ด้วย 0.03% DAB, 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS

บทที่ 4

ผลของการทดลอง

1. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 เก็บแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวแล้วนำมาทดสอบความจำเพาะกับ *A. hydrophila* 4 ไอโซเลต โดยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูทั้ง 4 ตัวสามารถจับกับแถบแอนติเจนของ *A. hydrophila* ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งหนูตัวที่ 1 ให้ผลการตอบสนองดีที่สุด โดยพบแถบโปรตีนเป็นจำนวนมากและชัดเจนกว่าหนูตัวอื่นๆ (ภาพประกอบ 9) ดังนั้นจึงได้นำหนูตัวที่ 1 นี้มาทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

2. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่ามี culture media ประมาณ 150 หลุม ที่ให้ผลบวก จากประมาณ 3,000 หลุม โดยแต่ละหลุมมีโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-3 โคลน และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting, immunohistochemistry และจากปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบพบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 37 โคลน ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นไม่มาก โดยสามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 16 กลุ่ม (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 10)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดลองสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ออกเป็น 16 กลุ่ม (ตาราง 6) ดังนี้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มแรก ประกอบด้วยแอนติบอดี 1 โคลน คือ AH200 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH1 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10) สามารถจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20-120 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน คือ AH10-1D, AH21-2E และ AH24-2B ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH2 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10) แอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่จับกับแถบโปรตีนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western

blotting และไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ AH2-2C ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH3 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 และ 55 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 4 โคลน คือ AH12-1F, AH13-7E, AH14-11C และ AH25-5G ซึ่งจับกับ *A. hydrophila* AH3 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. sobria* AS5, *A. sobria* AS7 และ *A. caviae* AC1 (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-70 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 4 โคลน คือ AH207, AH3-5G, AH20-5G และ AH20-6E ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* 2 ไอโซเลต คือ AH4 และ AH6 จากทั้งหมด 12 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20-70 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน คือ AH8-3G, AH14-8G และ AH18-11F ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH7 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-120 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 2 โคลน คือ AH12-2A และ AH16-5A ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH8 เพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้น ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 35-55 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ AH159 ซึ่งจับกับ *A. hydrophila* 8 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ในการทดสอบคือ *A. hydrophila* AH1, AH3, AH4, AH5, AH6, AH8, AH9 และ AH10 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. caviae* AC6

(ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-70 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 12)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ AH129 ซึ่งมีความจำเพาะคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 8 คือจับกับ *A. hydrophila* 8 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ในการทดสอบคือ *A. hydrophila* AH1, AH3, AH4, AH5, AH6, AH8, AH9 และ AH10 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. caviae* AC3 และ AC6 (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-70 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 5 โคลน คือ AH38, AH252, AH366, AH4-8H และ AH17-3E ซึ่งจับกับ *A. hydrophila* 2 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ในการทดสอบคือ *A. hydrophila* AH5 และ AH9 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. sobria* AS1 และ *A. caviae* AC3 (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 35-60 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน คือ AH1-8D, AH2-1A และ AH3-12E ซึ่งจับกับ *A. hydrophila* 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ในการทดสอบคือ *A. hydrophila* AH5, AH8 และ AH9 (ภาพประกอบ 10) แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. sobria* AS1 และ *A. caviae* AC3 โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-60 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 12 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน คือ AH1-4G, AH1-5A และ AH3-4D ซึ่งจับกับ *A. hydrophila* 4 ไอโซเลต จากทั้งหมด 12 ไอโซเลต ที่ใช้ในการทดสอบคือ *A. hydrophila* AH2, AH5, AH8 และ AH9 แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. sobria* AS1 และ *A. caviae* AC3 (ภาพประกอบ 10) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ และแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่จับกับแถบโปรตีนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 13 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ AH413 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบ ยกเว้น *A. hydrophila* AH2, AH11, *A. sobria* AS4 และ *A. jandaei* (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับ LPS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-70 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 14 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ AH3-9C มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบด้วย affinity ต่างกัน (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 และ 35 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 15 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน คือ AH396 มีความจำเพาะคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 14 สามารถจับกับแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 16 ประกอบด้วยแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน คือ AH2-2G, AH12-10E และ AH19-9A มีความจำเพาะคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 15 สามารถจับกับแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกสปีชีส์ที่ใช้ทดสอบ แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Photobacterium damsela* เล็กน้อยด้วย (ภาพประกอบ 10) โดยจับกับโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 11) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ (ภาพประกอบ 13)

4. การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

จากการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 (AH10-1D, AH21-2E และ AH24-2B) กลุ่มที่ 4 (AH12-1F, AH13-7E, AH14-11C และ AH25-5G) กลุ่มที่ 6 (AH8-3G, AH14-8G และ AH18-11F) กลุ่มที่ 7 (AH12-2A และ AH16-5A) กลุ่มที่ 10 (AH38, AH252, AH366, AH4-8H และ AH17-3E) กลุ่มที่ 12 (AH1-4G, AH1-5A และ AH3-4D) และกลุ่มที่ 16 (AH2-2G, AH12-10E และ AH19-9A) ซึ่งนำแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (combine) พบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งไม่ได้นำแอนติบอดีอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมาผสมรวมกัน (ตาราง 7, 8, 9 และ 10) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันนี้จับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 5 (AH207, AH3-5G, AH20-5G และ AH20-6E) นั้นเมื่อเทียบในระหว่างกลุ่มเดียวกันแล้วพบว่าแอนติบอดี AH207 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าแอนติบอดี AH3-5G, AH20-5G และ AH20-6E และเมื่อนำแอนติบอดี AH207 มาผสมรวมกับแอนติบอดี AH3-5G และ AH20-5G พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มสูงขึ้น (ตาราง 8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดี AH207 นี้จับกับอีพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างจาก

การจับโดยแอนติบอดี AH3-5G และ AH20-5G ส่วนค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในกลุ่มที่ 11 (AH1-8D, AH2-1A และ AH3-12E) นั้นพบว่าเมื่อนำแอนติบอดี AH3-12E มาผสมรวมกับแอนติบอดี AH1-8D และ AH2-1A พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มสูงขึ้น (ตาราง 9) เช่นเดียวกันกับแอนติบอดี AH207 ในกลุ่มที่ 5 แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดี AH3-12E นี้จับกับอีพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างจากการจับโดยแอนติบอดี AH1-8D และ AH2-1A

5. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

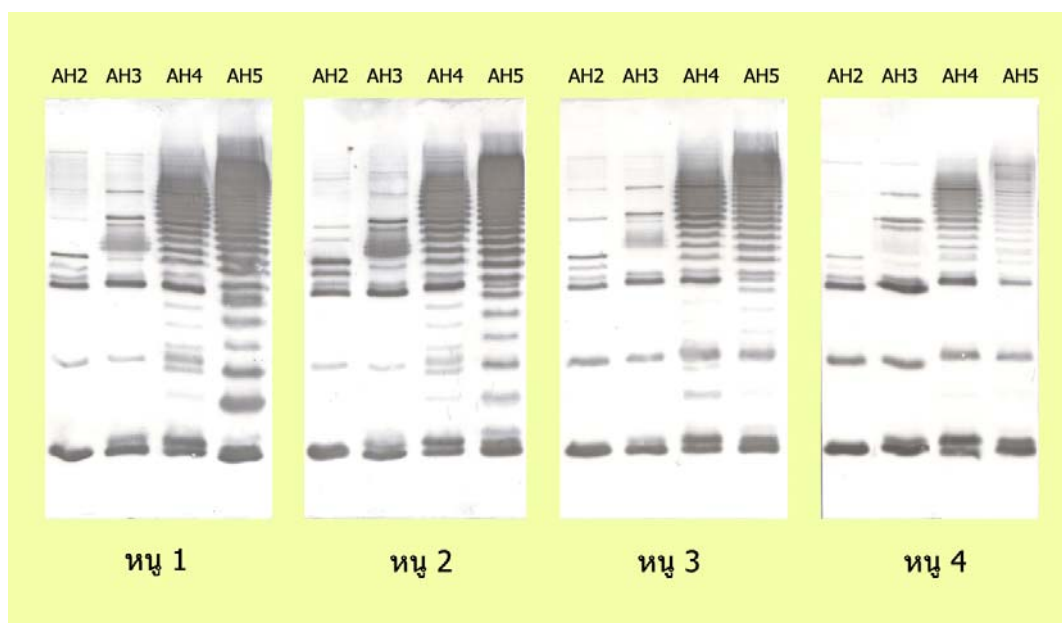
โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 16 กลุ่มที่ผลิตได้มี class และ subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ และ IgM (ตาราง 6)

6. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. hydrophila* โดยวิธี dot blotting

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหา *A. hydrophila* โดยวิธี dot blotting ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10^7 ถึง 10^5 CFU/ml. ซึ่งพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 มีความไวในการตรวจสูงที่สุดคือที่ 1×10^5 CFU/ml. (ตาราง 6 และภาพประกอบ 14)

7. การตรวจสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างปลาหิล

หลังจากการบ่ม *A. hydrophila* AH7 ในตัวอย่างปลาหิลได้ 3 ชั่วโมง พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH8-3G ซึ่งมีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* AH7 สามารถตรวจจับ *A. hydrophila* AH7 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 1 CFU/ml (ภาพประกอบ 15A) ทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* นั้น จะสามารถตรวจจับแบคทีเรียได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 10 CFU/ml (ภาพประกอบ 15B) หลังจากบ่มตัวอย่างตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 จะสามารถตรวจจับ *A. hydrophila* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 1 CFU/ml และสามารถตรวจพบแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ที่ปะปนในเนื้อเยื่อปลาได้ด้วย

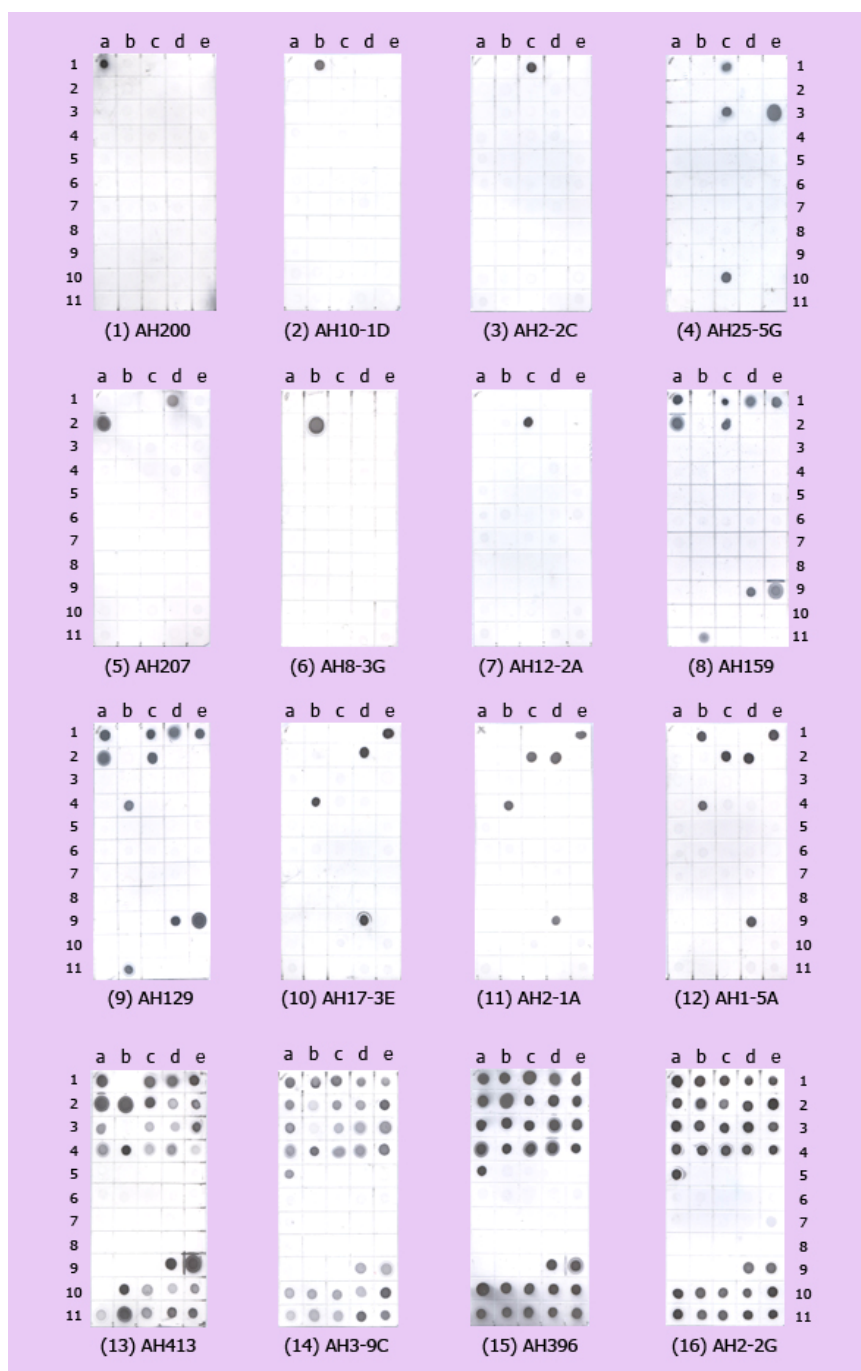


ภาพประกอบ 9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนุขาวทั้ง 4 ตัว ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *A. hydrophila* AH2, AH3, AH4 และ AH5 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปปฏิกิริยากับ mouse-anti *A. hydrophila* antiserum จากหนุขาวแต่ละตัว (1-4)

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

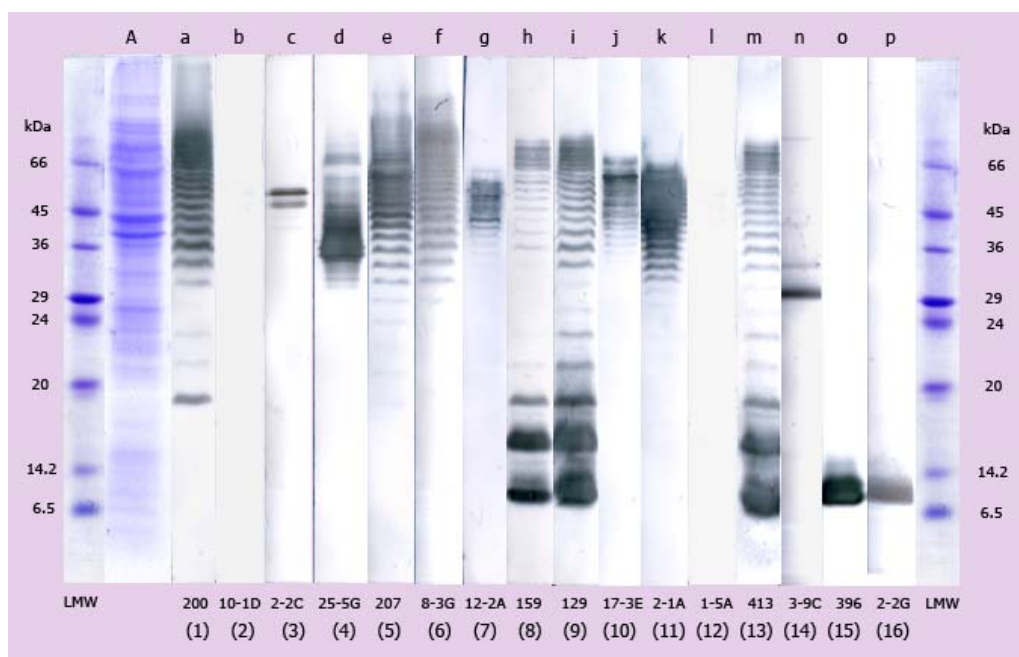
Group	MAb	Class subclass	Sensitivity: dot blotting (CFU/ml)	Antigen: Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial Specificity (Dot blotting)
1	AH200	IgG _{2b}	10 ⁵	20-120	+++	AH1
2	AH10-1D, 21-2E, 24-2B	IgM	10 ⁷	-	-	AH2
3	AH2-2C	IgG ₁	10 ⁷	50, 55	-	AH3
4	AH12-1F, 13-7E AH14-11C, 25-5G	IgG ₃ IgM	10 ⁶ 10 ⁶	30-70	+++ +++	AH3, AS5, AS7, AC1
5	AH207 AH3-5G, 20-5G AH20-6E	IgG _{2a} IgM IgM	10 ⁵ 10 ⁵ 10 ⁶	20-70	+ +++ +++	AH4, 6
6	AH8-3G AH14-8G AH18-11F	IgG _{2a} IgG ₁ IgM	10 ⁵ 10 ⁶ 10 ⁶	30-120	+++ +++ +	AH7
7	AH12-2A, 16-5A	IgM	10 ⁷	35-55	+++	AH8
8	AH159	IgG _{2b}	10 ⁶	10-70	+++	AH1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, AC6
9	AH129	IgG _{2a}	10 ⁶	10-70	+++	AH1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, AC3, 6
10	AH38 AH252, 366 AH4-8H, 17-3E	IgG _{2a} IgG ₁ IgM	10 ⁵ 10 ⁵ 10 ⁷	35-60	++ ++ ++	AH5, 9, AS1, AC3
11	AH1-8D, 2-1A AH3-12E	IgM IgM	10 ⁶ 10 ⁷	30-60	+ +	AH5, 8, 9, AS1, AC3
12	AH1-4G, 1-5A, 3-4D	IgM	10 ⁷	-	+	AH2, 5, 8, 9, AS1, AC3
13	AH413	IgG _{2a}	10 ⁶	10-70	+++	AH, AS, AC, AV, Except AH2, 11, AS4, AJ
14	AH3-9C	IgG _{2b}	10 ⁷	30, 35	+	AH, AC, AS, AJ, AV
15	AH396	IgG _{2a}	10 ⁶	10	-	AH, AC, AS, AJ, AV
16	AH2-2G, 12-10E AH19-9A	IgG _{2a} IgM	10 ⁶ 10 ⁶	10	-	AH, AC, AS, AJ, AV <i>P. damsela</i> (+)

P. damsela = *Photobacterium damsela damsela*

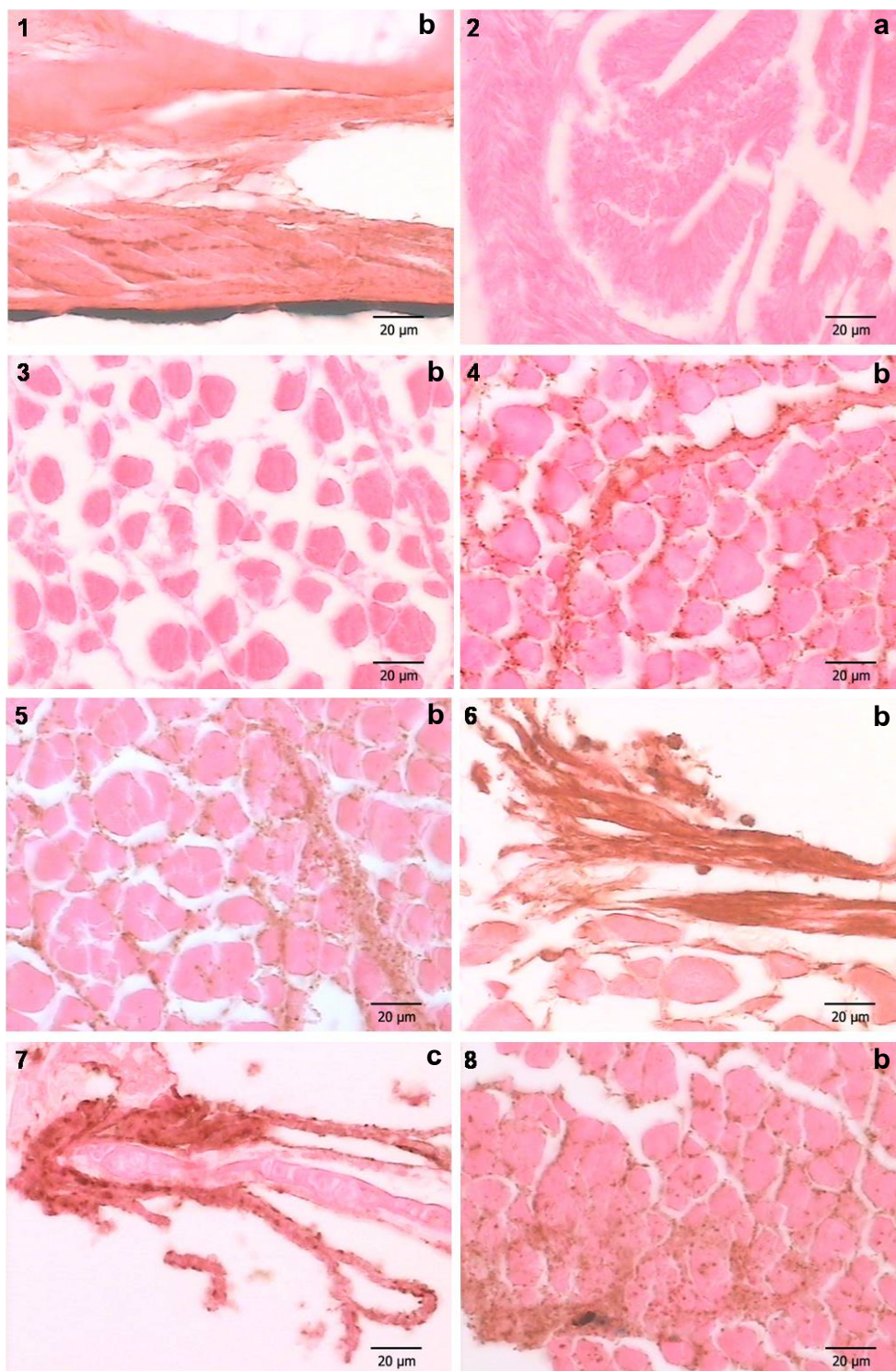


ภาพประกอบ 10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ (1-16) ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวแทนจากกลุ่มต่างๆ ได้แก่ (1) AH200, (2) AH10-1D, (3) AH2-2C, (4) AH25-5G, (5) AH207, (6) AH8-3G, (7) AH12-2A, (8) AH159, (9) AH129, (10) AH17-3E, (11) AH2-1A, (12) AH1-5A, (13) AH413, (14) AH3-9C, (15) AH396 และ (16) AH2-2G ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

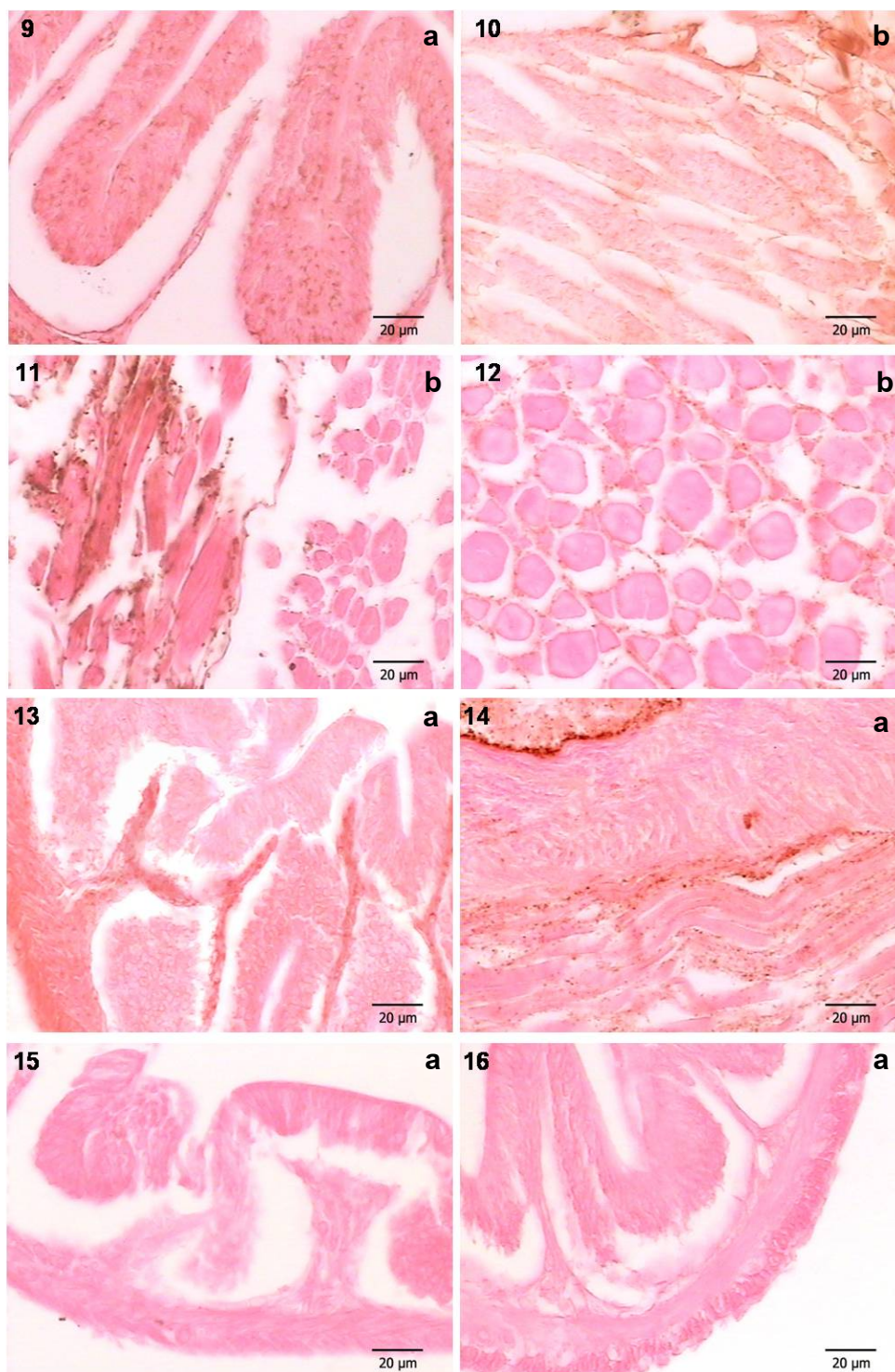
- แถวที่ 1: *A. hydrophila* (a) AH1; (b) AH2; (c) AH3; (d) AH4; (e) AH5
- แถวที่ 2: *A. hydrophila* (a) AH6; (b) AH7; (c) AH8; (d) *A. sobria* AS1; (e) *A. sobria* AS2
- แถวที่ 3: *A. sobria* (a) AS3; (b) AS4; (c) AS5; (d) AS6; (e) *A. caviae* AC1
- แถวที่ 4: *A. caviae* (a) AC2; (b) AC3; (c) AC4; (d) AC5; (e) *A. veronii*
- แถวที่ 5: (a) *A. jandaei*; (b) *Plesiomonas shigelloides* 22107; (c) *P. shigelloides* 22108; (d) *P. shigelloides* 22109; (e) *V. cholera*
- 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. penaeicida*; (d) *V. vulnificus*; (e) *Photobacterium damsela damsela*
- แถวที่ 8: (a) *Photobacterium damsela piscicida*; (b) *Salmonella* Typhi; (c) *Salmonella* Enteritidis; (d) *Escherichia coli*; (e) *Enterobacter cloacae*
- แถวที่ 9: (a) *Shigella flexneri*; (b) *Pseudomonas aeruginosa*; (c) *Proteus vulgaris*; (d) *A. hydrophila* AH9; (e) AH10
- แถวที่ 10: *A. hydrophila* (a) AH11; (b) AH12; (c) *A. sobria* AS7; (d) *A. sobria* AS8; (e) *A. sobria* AS9
- แถวที่ 11: (a) *A. sobria* AS10; (b) *A. caviae* AC6; (c) AC7; (d) AC8; (e) AC9



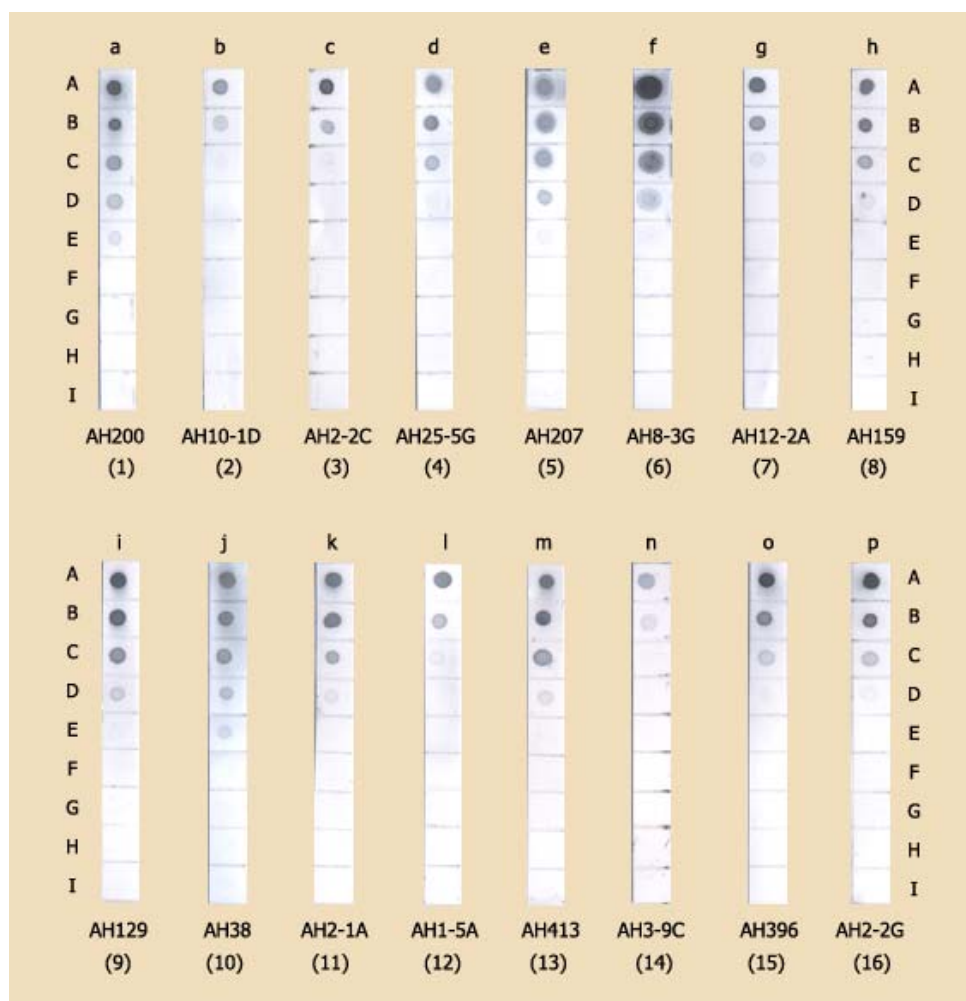
ภาพประกอบ 11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ a = AH1, b = AH2, c = AH3, d = AH3, e = AH6, f = AH7, g = AH8, h = AH1, i = AH1, j = AH5, k = AH8, l = AH5, m = AH1, n = AH5, o = AH1 และ p = AH1 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) แล้วนำโปรตีนจากเจลย้ายลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ ได้แก่ (1) AH200 (2) AH10-1D (3) AH2-2C (4) AH25-5G (5) AH207 (6) AH8-3G (7) AH12-2A (8) AH159 (9) AH129 (10) AH17-3E (11) AH2-1A (12) AH1-5A (13) AH413 (14) AH3-9C (15) AH396 และ (16) AH2-2G LMW = โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ A = *A. hydrophila* AH1 แยกด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) แล้วย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue



ภาพประกอบ 12 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปลานิล (a) ลำไส้ (b) กล้ามเนื้อ และ (c) เหงือก ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธีการฉีด โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ และนำไปย้อมทับด้วยสียีโอซิน (1) AH200 (2) AH10-1D (3) AH2-2C (4) AH25-5G (5) AH20-5G (6) AH8-3G (7) AH12-2A และ (8) AH159



ภาพประกอบ 13 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี immunohistochemistry ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปลาไน (a) ลำไส้ และ (b) กล้ามเนื้อ ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *A. hydrophila* ด้วยวิธีการฉีด โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ และนำไปย้อมทับด้วยสีย้อมไอซิ่น (9) AH129 (10) AH17-3E (11) AH2-1A (12) AH1-5A (13) AH413 (14) AH3-9C (15) AH396 และ (16) AH2-2G



ภาพประกอบ 14 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. hydrophila* ด้วยวิธี dot blotting โดยหยด *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ a = AH1, b = AH2, c = AH3, d = AH3, e = AH6, f = AH7, g = AH8, h = AH1, i = AH1, j = AH5, k = AH5, l = AH5, m = AH5, n = AH1 o = AH5 และ p = AH1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 1×10^9 CFU/ml. จนถึง 10 CFU/ml. ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มต่างๆ (1-16) ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

แถว A : 1×10^9 CFU/ml.

แถว B : 1×10^8 CFU/ml.

แถว C : 1×10^7 CFU/ml.

แถว D : 1×10^6 CFU/ml.

แถว E : 1×10^5 CFU/ml.

แถว F : 1×10^4 CFU/ml.

แถว G : 1×10^3 CFU/ml.

แถว H : 1×10^2 CFU/ml.

แถว I : 1×10^1 CFU/ml.

ตาราง 7 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ในกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยวิธี indirect ELISA

	กลุ่มที่ 1				กลุ่มที่ 2				กลุ่มที่ 3				กลุ่มที่ 4			
MAbs	AH 200	AH 10-1D	AH 21-2E	AH 24-2B	AH 2-2C	AH 12-1F	AH 13-7E	AH 14-11C	AH 25-5G							
AH 200	0.749															
AH 10-1D		0.384 ¹	0.393	0.470												
AH 21-2E			0.407 ¹	0.468												
AH 24-2B				0.495 ¹												
AH 2-2C					0.449											
AH 12-1F						0.926 ¹	0.930	0.893	0.913							
AH 13-7E							0.939 ¹	0.949	0.902							
AH 14-11C								0.751 ¹	0.764							
AH 25-5G									0.746 ¹							

¹ = โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันหมายถึงมีการจับกับอีพิโทปของแอนติเจนบริเวณเดียวกัน

ตาราง 8 การตรวจสอบอิมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ในกลุ่มที่ 5, 6, และ 7 โดยวิธี indirect ELISA

	กลุ่มที่ 5				กลุ่มที่ 6			กลุ่มที่ 7	
MAbs	AH 207	AH 3-5G	AH 20-5G	AH 20-6E	AH 8-3G	AH 14-8G	AH 18-11F	AH 12-2A	AH 19-9A
AH 207	0.829 ¹	0.887	0.918	0.721					
AH 3-5G		0.745 ²	0.724	0.706					
AH 20-5G			0.753 ²	0.691					
AH 20-6E				0.358 ²					
AH 8-3G					1.034 ¹	1.034	1.032		
AH 14-8G						0.905 ¹	0.906		
AH 18-11F							0.712 ¹		
AH 12-2A								0.485 ¹	0.710
AH 19-9A									0.786 ¹

^{1, 2} = โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันหมายถึงมีการจับกับอิมูโนโพรบของแอนติเจนบริเวณเดียวกัน หากตัวเลขต่างกันหมายถึงมีการจับกับอิมูโนโพรบของแอนติเจนบริเวณต่างกัน

ตาราง 9 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ในกลุ่มที่ 8, 9, 10 และ 11 โดยวิธี indirect ELISA

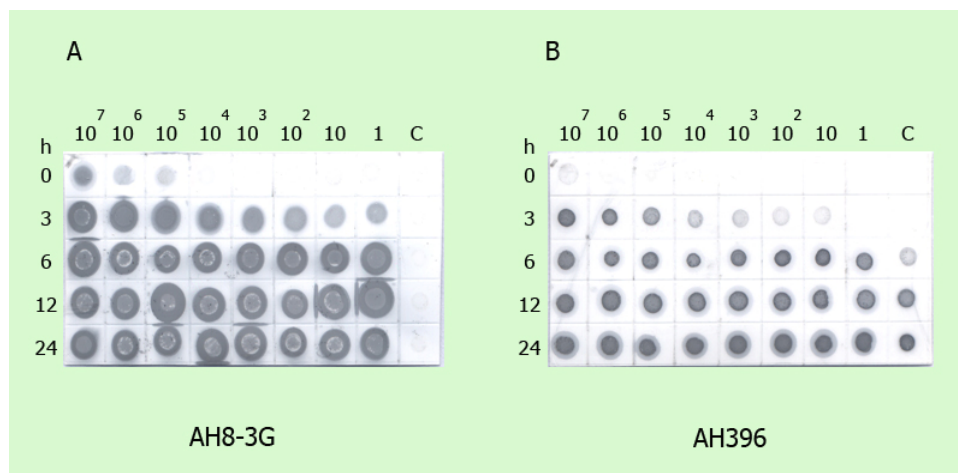
กลุ่มที่ 8		กลุ่มที่ 9		กลุ่มที่ 10				กลุ่มที่ 11		
MAbs	AH 159	AH 129	AH 38	AH 252	AH 366	AH 4-8H	AH 17-3E	AH 1-8D	AH 2-1A	AH 3-12E
AH 159	0.751									
AH 129		0.748								
AH 38			0.964 ¹	0.936	0.976	0.875	0.966			
AH 252				0.879 ¹	0.870	0.772	0.871			
AH 366					0.945 ¹	0.830	0.885			
AH 4-8H						0.464 ¹	0.659			
AH 17-3E							0.776 ¹			
AH 1-8D								0.595 ¹	0.595	0.656
AH 2-1A									0.613 ¹	0.641
AH 3-12E										0.606 ²

^{1,2} = โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันหมายถึงมีการจับกับอีพิโทปของแอนติเจนบริเวณเดียวกัน หากตัวเลขต่างกันหมายถึงมีการจับกับอีพิโทปของแอนติเจนบริเวณต่างกัน

ตาราง 10 การตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ ในกลุ่มที่ 12, 13, 14, 15 และ 16 โดยวิธี indirect ELISA

	กลุ่มที่ 12			กลุ่มที่ 13	กลุ่มที่ 14	กลุ่มที่ 15	กลุ่มที่ 16		
MAbs	AH 1-4G	AH 1-5A	AH 3-4D	AH 413	AH 3-9C	AH 396	AH 2-2G	AH 12-10E	AH 19-9A
AH 1-4G	0.478 ¹	0.501	0.447						
AH 1-5A		0.521 ¹	0.515						
AH 3-4D			0.392 ¹						
AH 413				0.288					
AH 3-9C					0.433				
AH 396						0.745			
AH 2-2G							0.894 ¹	0.986	0.910
AH 12-10E								0.989 ¹	0.945
AH 19-9A									0.908 ¹

¹ = โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกันที่มีตัวเลขเหมือนกันหมายถึงมีการจับกับอีพิโทปของแอนติเจนบริเวณเดียวกัน



ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting หลังจากบ่ม *A. hydrophila* AH7 ความเข้มข้นต่างๆ ในเนื้อเยื่อปลาที่ผสมกับ tryptic soy broth ที่เวลา (h) ต่างๆ (C = control; ไม่ได้มีการผสมเชื้อลงใน tryptic soy broth) และนำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) AH8-3G ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH7 และ (B) AH396 ซึ่งมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในجنัส *Aeromonas*

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่เก็บได้จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวพบว่าหนูขาวทั้ง 4 ตัวนั้นให้การตอบสนองต่อแอนติเจน (*A. hydrophila*) แตกต่างกันไป เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวนั้นนั้นมีอิพิโทปเป็นจำนวนมาก จึงทำให้บี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอิพิโทปของแอนติเจน และเป็นผลให้มีการกระตุ้นการตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม ซึ่งซีรัมที่ได้จากหนูแต่ละตัวนั้นสามารถจับกับอิพิโทปของแอนติเจนได้หลากหลาย เมื่อตรวจดูปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมและแถบโปรตีนต่างๆ ของ *A. hydrophila* จากหนูขาวทั้ง 4 ตัวจะสังเกตเห็นแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งมีปรากฏให้เห็นในแต่ละไอโซเลตเท่านั้นโดยที่ไม่มีปรากฏให้เห็นในไอโซเลตอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. hydrophila* นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นแถบของแอนติเจนบางแถบซึ่งมีปรากฏให้เห็นใน *A. hydrophila* ทุกไอโซเลต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันเหล่านี้มีแอนติเจนชนิดเดียวกันร่วมกันอยู่ โดยหนูขาวตัวที่ 1 นั้นให้การตอบสนองที่ดีที่สุดเนื่องจากมีความเข้มข้นของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมากที่สุดในบรรดาหนูขาวทั้ง 4 ตัว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำหนูขาวตัวที่ 1 มาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา โดยคาดว่าจะทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจำแนก *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ ออกจากกัน จำแนก *A. hydrophila* ออกจากแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* และจำแนกแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ออกจากแบคทีเรียจีนัสอื่นได้

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 37 โคลน แบ่งออกได้เป็น 16 กลุ่มตามความจำเพาะ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2, 3, 6 และ 7 มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH1, AH2, AH3, AH7 และ AH8 ตามลำดับ โดยไม่จับกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *A. hydrophila* AH1, AH2, AH3, AH7 และ AH8 นั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1, 2, 3, 6 และ 7 นี้ สามารถแยกความแตกต่างของ *A. hydrophila* ได้ ดังนั้นจึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1, 2, 3, 6 และ 7 ไปใช้ในการจำแนก *A. hydrophila* AH1, AH2, AH3, AH7 และ AH8 ออกจาก *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* AH4 และ AH6 โดยไม่จับกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่มีอยู่ร่วมกันเฉพาะใน *A. hydrophila* AH4 และ AH6 เท่านั้น และสามารถใช้อันติบอดีกลุ่มนี้จำแนก *A. hydrophila* AH4 และ AH6 ออกจาก *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่นได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 14 และ 15 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ แต่ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 14 จับกับแถบแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 และ 35 กิโลดาลตัน ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 15 จับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน เป็นไปได้ว่าอีพิโทปที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองกลุ่มนี้เป็นอีพิโทปของแอนติเจนที่มีอยู่ในทุกสปีชีส์ของแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas*

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 16 มีความจำเพาะคล้ายกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 15 คือมีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ และจับกับแถบของแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 15 แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 16 นั้นแสดงปฏิกิริยาข้ามอย่างอ่อนกับ *Photobacterium damsela damsela* ซึ่งให้เห็นว่า *Photobacterium damsela damsela* มีอีพิโทปของแอนติเจนที่มีอยู่ร่วมกันในแบคทีเรียจีนัส *Aeromonas*

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 4, 8, 9, 10, 11 และ 12 มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* บางไอโซเลตและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* คือ *A. sobria* และ *A. caviae* ซึ่งให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้จับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่มีอยู่ร่วมกันในแบคทีเรียจีนัส *Aeromonas*

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 13 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ทุกไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบยกเว้น *A. hydrophila* AH2, AH11, *A. sobria* AS4 และ *A. jandaei* โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้จึงแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น เป็นปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน จึงเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีในกลุ่มที่แสดงปฏิกิริยาข้าม อาจไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนซึ่งมีอยู่ร่วมกันในแบคทีเรียเหล่านี้ ปฏิกิริยาข้ามนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ดังการทดลองของ Prahkarnkao และคนอื่นๆ (2005) ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* 1234 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 ที่ผลิตได้แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. sobria* และ *A. caviae* เช่นเดียวกับ Phianphak และคนอื่นๆ (2005) ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *V. harveyi* ก็พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางกลุ่มที่ผลิตได้ ทำปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ได้ด้วยเช่นกัน

ในการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH207 ในกลุ่ม 5 จับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างไปจากแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อนำแอนติบอดีในกลุ่มนี้มาผสมกันมีค่าเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH3-12E ในกลุ่มที่ 11 ที่ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเมื่อนำแอนติบอดีในกลุ่มนี้มาผสมกัน แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH3-12E จับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่แตกต่างไปจากแอนติบอดีในกลุ่มเดียวกัน

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทุกกลุ่ม สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อปลาชนิดโดยวิธี immunohistochemistry ได้ ยกเว้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2, 3, 15 และ 16 ที่ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH3-5G, AH20-5G และ AH20-6E ในกลุ่มที่ 5 ที่สามารถตรวจการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ดีกว่า AH207 ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากมี class ของอิมมูโนโกลบูลินเป็นแบบ IgM ซึ่งจะมีแรงจับรวมของแอนติบอดี (antibody avidity) สูงกว่า AH207 ซึ่งมี class และ subclass เป็น IgG_{2a} ซึ่ง IgM นั้นจะมีลักษณะโมเลกุลเป็นแบบ pentamer มีบริเวณที่จับกับแอนติเจน 10 ตำแหน่งอยู่รอบๆ นอก จำนวนตำแหน่งที่จับแอนติเจนมากกว่าทำให้ IgM สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 86,143) แต่แอนติบอดี AH18-11F ในกลุ่มที่ 6 ซึ่งมี class เป็น IgM สามารถตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อได้น้อยกว่าแอนติบอดี AH8-3G และ AH14-8G ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันซึ่งมี class และ subclass เป็น IgG_{2a} และ IgG₁ นั้นอาจเนื่องมาจากกระบวนการในวิธี immunohistochemistry เนื้อเยื่อต้องผ่านการทำให้คงรูปด้วยฟอร์มาลิน และ แอลกอฮอล์ จึงทำให้แอนติบอดีที่มี class เป็น IgM ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่นั้น ไม่สามารถเข้าไปจับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่มีขนาดเล็กและหนาแน่นภายในเซลล์ที่ถูกทำให้คงรูปได้ดีนัก

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยง (pre-enrichment) ในตัวอย่างปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อ *A. hydrophila* AH7 นั้น พบว่าสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี AH8-3G ซึ่งมีความจำเพาะกับ *A. hydrophila* AH7 ตรวจจับ *A. hydrophila* AH7 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดประมาณ 1 CFU/ml. เมื่อบ่มเชื้อไป 3 ชั่วโมง และพบว่าในเนื้อเยื่อปลาที่นำมาทำการทดลองนั้น มีแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ปะปนอยู่ด้วย จากการทดสอบโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี AH396 ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* เมื่อบ่มเชื้อตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะปรากฏผลบวกในกลุ่มควบคุม ที่ไม่มีการผสมเชื้อลงในอาหาร แสดงให้เห็นว่าปลาในธรรมชาติมีแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* อาศัยอยู่ก่อนแล้ว ซึ่งจะเห็นได้ว่าสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ได้ด้วยความไวสูงกว่า 1 CFU/ml. โดยใช้เวลาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียอีกประมาณ 6 ชั่วโมง และเวลาทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีกประมาณ 6 ชั่วโมง สามารถพิสูจน์ทราบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* ได้โดยตรง โดยไม่ต้องทำการแยกเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งวิธีนี้มีความจำเพาะและความไวใกล้เคียงกับวิธี PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ประมาณ 10 CFU/ml. (Cascón; et al. 1996: 1167-1170)

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายกลุ่มที่มีความจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* ไอโซเลตอื่นและแบคทีเรียชนิดอื่น ได้ด้วยความไวสูง 10^5 - 10^7 CFU/ml. ทำให้สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จำแนก *A. hydrophila* ไอโซเลตต่างๆ ออกจากกันและจำแนกออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ได้มากกว่างานวิจัยที่เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Chanphong; et al. 2002: 355-360;

Delamare; et al. 2002: 936-940; Prahkarnkaeo. 2005) และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความไวสูงกว่าหรือเทียบเท่าที่ 10^6 และ 10^7 (Prahkarnkaeo. 2005) อีกทั้งยังได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรียในจีโนส *Aeromonas* จึงสามารถใช้แอนติบอดีนี้จำแนกแบคทีเรียในจีโนส *Aeromonas* ออกจากแบคทีเรียอื่นได้ และอาจใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆ กลุ่มรวมกันในการตรวจหา *A. hydrophila* เพื่อให้ครอบคลุมกับไอโซเลตต่างๆ ของ *A. hydrophila* มากที่สุด

จากงานวิจัยนี้มีข้อเสนอแนะว่า ควรนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปตรวจหาแบคทีเรียในตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ เช่น ตัวอย่างจากมนุษย์ สัตว์ อาหาร หรือแหล่งน้ำ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จุฬามาศ เทพชัยศรี. (2542). เอกสารคำสอน วิชา สข214 จุลชีววิทยาในทางสาธารณสุข. (เอกสารประกอบคำสอน). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสุขศึกษา คณะพลศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา.
- ชลอ ลิมสุวรรณ. (2528). โรคปลา. (เอกสารประกอบการสอน). กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. อัดสำเนา.
- นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ; และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. (2547). จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปภาศิริ ศรีโสภารัตน์. (2538). โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ. สหมิตรพรินติ้ง.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. อัดสำเนา.
- 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.
- Angka, S. L.; Lam, T. J.; & Sin, Y. M. (1995). Some Virulence Characteristics of *Aeromonas hydrophila* in Walking Catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*. 130: 103-112.
- Angka, S. L.; Wongkar, G. T.; & Karwani, W. (1988). Blood Picture and Bacteria Isolated from Ulcered and Crooked-Back *Clarias batrachus*. *BIOTROP Spec. Publ. No.* 28: 129-137.
- Areerat, S. (1987). *Clarias* Culture in Thailand. *Aquaculture*. 63: 355-362.
- Aslani, M. M.; & Hamzeh, H. S. (2004). Characterization and Distribution of Virulence Factors in *Aeromonas hydrophila* Strains Isolated from Fecal Samples of Diarrheal and Asymptomatic Healthy, in Ilam, Iran. *Iranian Biomedical Journal*. 8: 199-203.
- Baloda, B. S.; et al. (1995). Detection of Aerolysin Gene in *Aeromonas* Strains Isolated from Drinking Water, Fish and Food by the Polymerase Chain Reaction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 18: 17-26.

- Boonsanongchokying, C.; et al. (2006). Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedron of Monodon Baculovirus (MBV) from Shrimp. *ScienceAsia*. 32: 371-376.
- Burke, V.; et al. (1981). Exotoxins of *Aeromonas hydrophila*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 59: 753-761.
- Cartwright, G. A.; et al. (1994). Immunodiagnosis of Virulent Strains of *Aeromonas hydrophila* Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Using a Monoclonal Antibody. *Journal of Fish Diseases*. 17: 123-133.
- Cascón, A.; et al. (1996). Identification of *Aeromonas hydrophila* Hybridization Group 1 by PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1167-1170.
- Chanphong, J.; et al. (2002). Production and Characterization of a Monoclonal Antibody against *Aeromonas hydrophila*. In *Diseases in Asian Aquaculture*. Lavilla-Pitogo, C. R.; & Cruz-Lacierda, E. R. pp. 355-360. IV. Philippines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Charni, N.; et al. (2000). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Vegetative Cells of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2278-2281.
- Chen, P.; et al. (1992). Development of Monoclonal Antibodies That Identify *Vibrio* Species Commonly Isolated from Infections of Humans, Fish and Shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3694-3700.
- Chopra, A. K.; & Houston, C. W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated Gastroenteritis. *Microbes and Infection*. 1: 1129-1137.
- Cipriano, R. C. (2001). *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. *Rev. Fish Dis. Leaflet*. 68.
- Colakoglu, F. A.; Sarmasik, A.; & Koseoglu, A. (2006). Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. In *Shellfish Harvested Off Dardanelles Cost of Turkey*. Food Control. 17: 648-652.
- Delamare, A. P. L.; et al. (2002). Production of a Monoclonal Antibody Against *Aeromonas hydrophila* and its Application to Bacterial Identification. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 936-940.
- Daskalov, H. (2006). The Importance of *Aeromonas hydrophila* in Food Safety. *Food Control*. 17: 474-483.

- Ghenghesh, K. S.; et al. (1999). Isolation and Haemolytic Activity of *Aeromonas* Species from Domestic Dogs and Cats. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 22: 175-179.
- He, Y.; et al. (1996). Monoclonal Antibodies for Detection of the H:7 Antigen of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3325-3332.
- Hird, D. W.; et al. (1983). *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota Frogs and Tadpoles (*Rana pipiens*). *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 1423-1425.
- Honda, T.; et al. (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.
- Howard, S. P.; & Buckley, J. T. (1985). Activation of the Hole-forming Toxin Aerolysin by Extracellular Processing. *Journal of Bacteriology*. 163: 336-340.
- Janda, J. M.; & Abbott, S. L. (1996). Human Pathogens. In *The Genus Aeromonas*. Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P. J.; & Joseph, S. W. pp. 151-174. New York: John Wiley and Sons.
- Janda, J. M.; & Abbott, L. H. (1998). Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas*: An Expanding Panorama of Species, Disease Presentations, and Unanswered Question. *Clinical Infectious Diseases*. 27: 332-344.
- Jung, T. S.; et al. (2001). The Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and Initial Observations Using Immunohistochemistry. *Journal of Fish Diseases*. 24: 67-77.
- Kelley, T. R.; et al. (1998). Antibiotic Resistance of Bacterial Litter Isolates. *Poultry Science*. 77: 243-247.
- Köhler, G.; & Milestein, C. (1975). Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*. 256: 495-497.
- Krovacek, K.; et al. (1989). Enterotoxigenicity and Drug Sensitivity of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Well Water in Sweden: A Case Study. *International Journal of Food Microbiology*. 8: 149-154.
- Krovacek, K.; et al. (1998). *Aeromonas hydrophila* Septicemia in a Grey Seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: A Case Study. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*. 21: 43-49.

- Lai, C. C.; et al. (2007). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* Bacteremia: Rare Pathogens of Infection in Burn Patient. *Burn*. 33: 255-257.
- Llobrela, A. T.; & Gacutan, R. Q. (1987). *Aeromonas hydrophila* Associated with Ulcerative Disease in Laguna de Bay, Philippines. *Aquaculture*. 67: 273-278.
- Lu, P.; et al. (1997). Characterization of Monoclonal Antibodies for the Rapid Detection of Foodborne *Campylobacters*. *International Journal of Food Microbiology*. 37: 87-91.
- Macfaddin, J. F. (2002). *Biochemical Tests for Identification of Medicine bacteria*. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins: 647.
- Makesh, M.; et al. (2006). Development of Monoclonal Antibodies Against VP28 of WSSV and Its Application to Detect WSSV Using Immunocomb. *Aquaculture*. 261: 64-71.
- Mitchell, A. J.; & Plumb J. A. (1980). Toxicity and Efficacy of Furanace on Channel Catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) Infected Experimentally with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*. 3: 93-99.
- Ørmen, Ø.; et al. (2003). Studies of Aerolysin Promoter from Different *Aeromonas* spp. *Microbial Pathogenesis*. 35: 189-196.
- 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.
- Pasquale, V.; et al. (1994). An Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Infection in Turtles (*Pseudemys scripta*). *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 1678-1680.
- Phianphak, W.; et al. (2005). Production of Monoclonal Antibodies for Detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 161-168.
- Pitarangsi, C.; et al. (1982). Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: Prevalence Among Individuals with and without Diarrhea in Thailand. *Infection and Immunity*. 35: 666-673.
- Prahkarnkao. K. ; et al. (2005). Production of monoclonal antibodies specific to *Aeromonas hydrophila* using whole cell antigens. In 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18-20 October: B0038.
- Pusiririt, S.; et al. (2005). Differentiation of two isolates of *Vibrio vulnificus* with monoclonal antibody. In 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18-20 October: B0037.

- Roberts, R. J.; Frerichs, G. N.; & Miller, S. D. (1992). Epizootic Ulcerative Syndrome, the Current Position. In *Diseases in Asian Aquaculture*. Shariff, M.; Sabusinghe, R. J.; & Arthur, J. R. (Editors). pp. 431-436. I. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- Ruangpan, L.; Kitao, T.; & Yoshida, Y. (1986). Protective Efficacy of *Aeromonas hydrophila* Vaccines in Nile Tilapia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 12: 345-350.
- Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of Monoclonal Antibodies Specific to Hepatopancreatic Parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 85-89.
- Shao, J. Z.; Liu, J.; & Xiang, L. X. (2004). *Aeromonas hydrophila* Induces Apoptosis in *Carassius auratus* Lymphocytes in vitro. *Aquaculture*. 229: 11-23.
- Shotts, E. B., Jr.; & Rimler, R. (1973). Medium for the Isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Applied Microbiology*. 26: 550-553.
- Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal Antibodies Specific to Yellow-Head Virus (YHV) of *Penaeus 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.
- 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.
- Tsai, G. J.; Tsai, F. C.; & Kong, Z. Y. (1997). Effects of Temperature, Medium Composition, pH, Salt and Dissolved Oxygen Haemolysin and Cytotoxin Production by *Aeromonas hydrophila* Isolated From Oyster. *International Journal of Food Microbiology*. 38: 111-116.
- Vivekanandhan, G.; Hatha, A. A. M.; & Lakshmanaperumalsamy, P. (2005). Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in Fish and Prawns from the Seafood Market of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*. 22: 133-137.
- Wang, C.; & Silva, J. L. (1999). Prevalence and Characterization of *Aeromonas* Species Isolated from Processed Channel Catfish. *Journal of Food Protection*. 62: 30-34.
- Wang, G.; et al. (2003). Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1048-1054.

- Winotaphan, P.; et al. (2005). Monoclonal Antibodies Specific to Haemocytes of Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 18: 189-198.
- Wohlgemuth, K.; Pierce, R. L.; & Kirkbride, C. A. (1972). Bovine Abortion Associated with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 160: 1001-1002.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกชอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตเน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.
ปรับ pH เป็น 7.3 ± 0.2		

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกชอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตเน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มล.
ปรับ pH เป็น 7.3 ± 0.2		

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	มล.

2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2	100.0	มล.
เมอร์ไธโอเลท (Merthiolate) เข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มล.

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โรซอล (Thimerosal) (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

ภาคผนวก ค
สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

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)	5.5925	กรัม
เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200	มก.
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000.0	มล.
กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 20%

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

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

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

4. สารละลายสำหรับหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol เข้มข้น 40%)

พอลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol)	2.0	กรัม
RPMI medium (1)	3.0	มล.
เติม RPMI (1) ลงในพอลิเอทิลีนไกลคอลที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้		

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide เข้มข้น 12%)

ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide) (Sigma)	12.0	มล.
RPMI medium (1)	88.0	มล.
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้		

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ

**SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL
ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) และ WESTERN BLOT**

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	มล.
เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

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

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มล.
ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N		

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

Tris	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มล.
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 N		

1.4 SDS เข้มข้น 10%

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มล.

1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น10% (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มล.

1.6 Running gel overlay

Tris เข้มข้น 0.15 โมลาร์ (1.2)	25.0	มล.
SDS เข้มข้น 10% (1.4)	1.0	มล.
น้ำกลั่น	100.0	มล.

1.7 2 X Treatment buffer

Tris เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5	มล.
SDS เข้มข้น 10% (1.4)	4.0	มล.
กลีเซอรอล	2.0	มล.
Beta-Mercaptoethanol	1.0	มล.
น้ำกลั่น	0.5	มล.

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	มล.
tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	7.5	มล.
SDS เข้มข้น 10%(1.4)	0.3	มล.
น้ำกลั่น	6.75	มล.
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (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	มล.
tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0	มล.
SDS เข้มข้น 10%(1.4)	0.2	มล.
น้ำกลั่น	12.2	มล.
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

ตาราง 1 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 มล.	2.66 มล.
tris-Cl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8(1.2)	7.5 มล.	-
tris-Cl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5.0 มล.
SDS เข้มข้น 10%	0.3 มล.	0.2 มล.
น้ำกลั่น	6.75 มล.	12.2 มล.
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% (1.4)	40.0	มล.
น้ำกลั่น	4000.0	มล.

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

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

สี Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

4.1.2 Stain

Stain stock (4.1.1)	50.0	มล.
เมทานอล	250.0	มล.
กรดอะซีติก	50.0	มล.
น้ำกลั่น	500.0	มล.

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

เมทานอล	500.0	มล.
กรดอะซีติก	100.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

เมทานอล	50.0	มล.
กรดอะซีติก	70.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

วิธีการย้อมและล้างเจล

ถอดเจลจากกระชกแช่ในสี Coomassie blue (4.1.2) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง
ล้างเจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา ½-1 ชั่วโมง จนเห็นแถบ
โปรตีน จากนั้นแช่เจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 2 (4.2.2) จนกระทั่งสีพื้นใสปราศจากสี

5. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma)

-Albumin, bovine serum	66	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 blot

Tris	3.03	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
เมทานอล	200.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

ก่อนนำบัฟเฟอร์ไปใช้ต้องนำไปแช่ให้เย็นจัด

ภาคผนวก จ
สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE
ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG₁ (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG_{2a} (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG_{2b} (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG₃ (γ 3 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% H₂O₂)
- 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% NaN₃)
- 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% NaN₃)
- 16) 50% Tween 20

วิธีการตรวจสอบ isotype และ subisotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 202)

- 1) เคลือบภาชนะ 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง
- 2) สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 3) เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

- 4) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 5) เติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด (1-8) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ A-H

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
IgG ₁	→	A													
IgG _{2a}	→	B													
IgG _{2b}	→	C													
IgG ₃	→	D													
IgA	→	E													
IgM	→	F													
Kappa	→	G													
Lambda	→	H													

- 6) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตรจำนวน 4 ครั้งๆ 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 ครั้งๆ 10 นาที

- 9) เตรียมสารละลาย 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 จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 1 N ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม
- 10) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรโดยใช้ microplate reader

ภาคผนวก จ

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	มล.
เมอร์ไธโอเลทเข้มข้น 1% (Sigma)	1.0	มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มล.

2. สารละลาย 0.5% Blotto

สารละลาย Blotto เข้มข้น 5% (1)	50.0	มล.
PBS 0.15 M pH 7.2	950.0	มล.

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

โซเดียมซิเตรท	29.41	กรัม
Merthiolate เข้มข้น 1%	10.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N		

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น)	27.0	มล.
น้ำกลั่น	1000.0	มล.

5. O-Phenylenediamine (OPD)

ภาคผนวก ข
 บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ
IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	30.0	มล.
ฟอร์มาลินเข้มข้น 100%	20.0	มล.
Glacial acetic acid	10.0	มล.
น้ำกลั่น	30.0	มล.

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	มล.

4. สารละลาย Calf serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10.0	มล.
PBS	100.0	มล.

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

สี Hematoxylin	8.0	กรัม
เอธิลแอลกอฮอล์ 95%	400.0	มล.
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มล.

กลีเซอริน (Glycerine)	400.0	มล.
Glacial acetic acid	400.0	มล.

6. สี Eosin Y 0.2% ใน 95% ethanol

สี Eosin Y	0.2	กรัม
เอทิลแอลกอฮอล์ 95%	100.0	มล.

การตรวจการติดเชื้อ *A. hydrophila* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี indirect immunoperoxidase (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 233-235)

1. วิธี Immunohistochemistry (IHC)

- 1.1 เก็บตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* แล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพโดยใช้สารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ 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 ครั้งๆ 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 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง
 - 1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราฟลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
 - 1.3.8 แช่ในพาราฟลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที
- 1.4 นำเนื้อเยื่อของปลานิลที่อินฟิเลตรด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราฟลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสีเหลือง
- 1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องไมโครทอมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละเซกชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิน (ribbon)
- 1.6 นำเซกชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำ

แถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซกชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยัดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกขับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- 1.7 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้
 - 1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้งๆ 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
 - 1.7.7 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
 - 1.7.8 แช่ในสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10% 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที
 - 1.7.9 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที
 - 1.7.10 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 1.8 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

2. วิธี Indirect immunoperoxidase

- 2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking)
 - 2.1.1 หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละเซกชันด้วยไมโครปิเปต
 - 2.1.2 ป่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
- 2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก
 - 2.2.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก
 - 2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละเซกชัน (แอนติบอดีตัวแรกคือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila*)
 - 2.2.3 นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
 - 2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
 - 2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง
 - 2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละเซกชันออก

- 2.3.2 หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)) ที่เจือจาง 1:1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุกเชค
ชั้น
- 2.3.3 ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเชคชั้นด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- 2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
- 2.4 นำเชคชั้นมาทำปฏิกิริยากับ 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที
- 2.5 ล้างเชคชั้นด้วยน้ำประปา 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอีโอซิน

- 3.1 ตึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที
- 3.2 ย้อมทับด้วยสีอีโอซิน 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 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการฝืนกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางฝืนก (permount)
- 3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวกัลยา ไชยสิทธิ์ตระกูล
วันเดือนปีเกิด	5 พฤศจิกายน 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่	3199 ม.10 ซ.แบริ่ง32 ถ.สุขุมวิท107 ต.สำโรงเหนือ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2551	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ