การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ Aeromonas Caviae

Production of Monoclonal Antibodies Specific to Aeromonas Caviae

หทัยทิพย์ สุขสดใส[1], ศิวาพร ลงยันต์[1], สมบัติ รักประทานพร[2], วีระวรรณ สิทธิกรกุล[1], ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร[1] และ ไพศาล สิทธิกรกุล[1]

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *Aeromonas caviae* (AC) 5 ไอโซเลตได้แก่ AC1, AC2, AC3, AC4 และ AC5 โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ในการปลูกภูมิคุ้มกัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นำมาทดสอบกับ *Aeromonas* spp. 21 ไอโซเลตและแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ 19 ชนิด สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 5 กลุ่ม คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 จำเพาะต่อ AC1 กลุ่มที่ 2 จำเพาะต่อ AC2 และ AC5 กลุ่มที่ 3 จำเพาะต่อ AC4 กลุ่มที่ 4 จำเพาะต่อ AC3 แต่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *A. hydrophila* และ *A. sobria* บางไอโซเลตด้วย และกลุ่มที่ 5 สามารถจับกับ *Aeromonas* spp. ทั้ง 21 ไอโซเลตที่ใช้ตรวจสอบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1–4 จับกับ lipopolysaccharide ขนาดต่างๆ กัน ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 จับกับโปรตีนขนาดเล็ก 20 kDa และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1–3 เท่านั้นที่สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อได้โดยวิธี immunohistochemistry ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *A. caviae* ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ epitope ร่วมซึ่งครอบคลุมไอโซเลตต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือสำหรับใช้พิสูจน์ทราบ *A. caviae*

Abstract

Five groups of monoclonal antibodies (MAbs) against five isolates of *Aeromonas caviae* (AC1, AC2, AC3, AC4 and AC5) were generated using whole cell of bacteria for immunization. The MAbs were tested with 21 isolates of *Aeromonas* spp. and 19 species of Gram negative bacteria. The MAbs were divided into 5 groups according to their specificity. The first group of MAbs was specific to AC1. The second group of MAbs was specific to AC2 and AC5. The third group of MAbs was specific to AC4. The fourth group of MAbs was specific to AC3 but demonstrated cross reactivity to some isolates of *A. hydrophila* and *A. sobria* and the fifth group of MAbs bound to all 21 isolates of *Aeromonas* spp.

tested. The antigens recognized by MAbs in group 1–4 were lipopolysaccharide with various sizes, while MAb in group 5 recognized small molecular weight 20 kDa antigen. Only MAbs in group 1–3 can be used to detect *A. caviae* infection in tissue by immunohistochemistry. This evidence demonstrates heterogeneity among various isolates for *A. caviae*; therefore, production of MAbs to common antigen of *A. caviae* is required to develop a specific tool for identification of *A. caviae*.

Keywords: *Aeromonas caviae*, monoclonal antibody, dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry

บทนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอาชีพที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรและประเทศได้ปีละจำนวนมาก ในปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ ให้ความสำคัญกับปัญหาโรคระบาดเป็นอย่างมาก ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุส่วนหนึ่งในการก่อโรคระบาดในสัตว์น้ำ ได้แก่เชื้อในสกุล *Aeromonas* โดยจะมี *A. hydrophila*, *A. sobria* และ *A. caviae* เป็นส่วนใหญ่ อีกทั้งยังสามารถก่อให้เกิดโรคหลายโรคในมนุษย์ เช่น โรคโลหิตเป็นพิษ (septicemia) การติดเชื้อทางบาดแผล หรือก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) [1] *A. caviae* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน [2] พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืด และน้ำกร่อย อาจพบว่ามีเชื้อนี้อยู่ตามระบบทางเดินอาหาร และตามผิวหนังของสัตว์น้ำโดยไม่ทำให้เกิดโรค ได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ เช่น พวกกบ [3] ปลาเทราท์ [4] และปลาที่เพาะเลี้ยงไว้ในแหล่งน้ำจืด [5] *A. caviae* ก่อให้เกิดสภาวะทางโรคได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *A. hydrophila* และ *A. sobria* แต่จะพบว่า *A. caviae* นี้ทำให้ระบบทางเดินอาหารอักเสบในคนได้ โดยทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นโรคท้องร่วงซึ่งมักพบในเด็กเล็ก ผู้ป่วยจะมีอาการถ่ายเป็นน้ำต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ มีไข้ และปวดท้อง [6] บางกรณีพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้มีเยื่อบุช่องท้องอักเสบ (peritonitis) [1] ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. caviae* ที่ติดมากับคอนแทคเลนส์ สามารถทำให้เกิดโรคแก้วตาอักเสบ (keratitis) [7] ได้เช่นกัน วิธีการที่ใช้ตรวจหาแบคทีเรียชนิดนี้โดยกระบวนการทางจุลชีววิทยา ได้แก่ การแยกเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมีซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีจำนวนมาก สำหรับการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) [8] ซึ่งจะให้ผลที่รวดเร็วและมีความแม่นยำแต่มีข้อจำกัดในเรื่องค่าใช้จ่ายสูงและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญ การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies: MAb) มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียชนิดนี้ โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกันสูงมาก ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากเซลล์ที่เจริญมาจากเซลล์ๆ เดียว มีความจำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจนที่ใช้เป็นตัวชักนำให้สร้างเท่านั้น เทคนิคนี้จึงมีความไวและความแม่นยำสูง ให้ผลรวดเร็ว สะดวก บุคคลทั่วไปและเกษตรกรสามารถนำไปใช้งานเองได้ ไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ [9] สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแบคทีเรียต่างๆ ในสกุล *Aeromonas* นั้น ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *A. hydrophila* [10, 11] แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* ดังนั้นจึงคาดว่าการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *A. caviae* เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *A. caviae* ในสัตว์น้ำและคน และแยกออกจาก *Aeromonas* spp. ได้น่าจะเป็นประโยชน์ และสามารถนำโมโนโคลนอล

แอนติบอดีไปประยุกต์ใช้ที่ได้นี้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีความไวเพิ่มขึ้นและความสะดวกในการใช้งานต่อไป

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจำแนก *A. caviae* ออกจาก *Aeromonas* spp. ต่างๆ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจเบื้องต้นโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. caviae*

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมแบคทีเรียและแอนติเจน

นำเชื้อแบคทีเรีย *A. caviae* 5 ไอโซเลต (AC1–5) และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตาราง 1 มาเลี้ยงใน tryptic soy agar (TSA) ส่วนแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เลี้ยงใน TSA ที่เติม NaCl เข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเซลล์ให้อยู่ในรูปสารแขวนลอยใน 0.15 M Phosphate Buffered Saline (PBS) ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 109 CFU/ml นำแบคทีเรียที่ได้มาทำให้ตายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแบ่งแอนติเจนออกเป็น 3 รูปแบบ คือ รูปแบบที่ 1 เป็นแบคทีเรียรูปแบบปกติ รูปแบบที่ 2 เป็นแบคทีเรียเสียสภาพโดยผสมแบคทีเรียกับสารละลาย 4% SDS และ 10% mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่น รูปแบบที่ 3 เป็นแบคทีเรียที่ผสมกับ 40% formaldehyde ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 แล้วนำไป dialysis ในน้ำกลั่น นำเชื้อที่เตรียมได้ทั้ง 3 รูปแบบมาแบ่งใส่ในหลอดไมโครฟิวส์แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เพื่อใช้สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูต่อไป [11]

2. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

นำแอนติเจนของ *A. caviae* 5 ไอโซเลตทั้ง 3 รูปแบบ มาผสมกันและนำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant แล้วฉีดเข้าที่ช่องท้องของหนูขาว (swiss mice) ปริมาตร 100 µl/ตัว หลังจากนั้นฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้แอนติเจนผสมกับ incomplete Freund's adjuvant หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เก็บซีรัมของหนูแต่ละตัวมาตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรัมต่อ *A. caviae* โดยวิธี Western blotting และเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาใช้สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป [9]

3. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาทำโดยหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูขาวกับ P3X myeloma cell line ด้วยพอลิเอทิลีนไกลคอลแล้วเลี้ยงในอาหาร HAT medium (Hypoxanthine Aminopterine Thymidine medium) ใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plates หลังจากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อ *A. caviae* โดยคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting นำแอนติเจนของ *A. caviae* ผสมทั้ง 3 รูปแบบ มาหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (ประมาณ 1 µl/จุด) นำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไปบ่มต่อใน goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1 ต่อ 1,500 ที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ที่ละลายใน PBS เลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ให้ผลบวกต่อ *A. caviae* แล้วนำไปคัดเลือกต่อในขั้นที่ 2 ซึ่งจะวิเคราะห์ด้วย Western blotting โดยนำ *A. caviae* ในรูปแบบปกติมาแยกใน 12% SDS-PAGE แล้วย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ไปบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ให้ผลเป็นบวกจากการคัดเลือกขั้นที่ 1 แล้วตรวจดูแถบของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี จากนั้นวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่หยดด้วยแอนติเจนของ *A. caviae* และแอนติเจนของ

แบคทีเรียชนิดต่างๆ (ประมาณ 10^9 CFU/จุด) บ่มทดสอบกับน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา โดยเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะต่อ *A. caviae* แต่ไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ส่วนการคัดเลือกโดยวิธี immunohistochemistry (IHC) ได้นำแอนติบอดีที่ให้ผลจาก dot blotting เป็นบวกมาทดสอบกับเนื้อเยื่อปลานิลที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อโดยการฉีด *A. caviae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ประมาณ 10^8 CFU/ml ปริมาตร 10 µl/ตัว แล้วนำไปทดสอบโดยวิธี indirect immunoperoxidase จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการทำสไลด์ถาวร ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะติดสีน้ำตาล จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกขั้นที่ 2 มา reclone โดยวิธี limited dilution ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ เก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้เก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป [9]

4. การตรวจสอบสมบัติและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จำแนกด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Mouse MonoAb ID Kit HRP (Zymed's Laboratory) ในการตรวจสอบ และทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *A. caviae* ด้วยวิธี dot blotting โดยนำ *A. caviae* ในรูปแบบที่ 1 (ประมาณ 109 CFU/ml) มาเจือจางแบบ serial ten-fold dilution ด้วย PBS แล้วนำไปหยดลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี แล้วตรวจดูระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ผลการวิจัย

จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *A. caviae* สามารถผลิตได้ 5 กลุ่ม (ตาราง 2) คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 มีความจำเพาะต่อ AC1 (ภาพประกอบ 1-1) สามารถจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 kDa และแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 80-105 kDa ด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 2-B1) สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ AC1 ในลำไส้ของปลานิลได้ด้วยวิธี IHC (ภาพประกอบ 3-1) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* 2 ไอโซเลตคือ AC2 และ AC5 (ภาพประกอบ 1-2) สามารถจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 kDa และจับกับแถบแอนติเจนที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 30-60 kDa (ภาพประกอบ 2-B2) และสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ AC5 ในกล้ามเนื้อของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 3-2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อ AC4 (ภาพประกอบ 1-3) สามารถจับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30-120 kDa (ภาพประกอบ 2-B3) สามารถตรวจพบการติดเชื้อ AC4 ในลำไส้ของปลานิลได้ (ภาพประกอบ 3-3) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อ AC3 และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับ AH5 และ AS1 (ภาพประกอบ 1-4) โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดนี้จับกับแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20-150 kDa (ภาพประกอบ 2-B4) แต่**ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อได้ด้วยวิธี** IHC โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* ทุก species จำนวน 21 ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 1-5) โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้จะจับกับแอนติเจนที่น้ำหนักโมเลกุล 20 kDa (ภาพประกอบ 2-B5) แต่**ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อ *A. caviae* ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี** IHC **ได้ แอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1-4 เป็นลักษณะของ** lipopolysaccharide **ซึ่งจะรวมเป็น** polymer **ขนาดต่าง ๆ ทำให้เห็นเป็น** ladder (ภาพประกอบ 2-B1-4) [11, 12] โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 5 กลุ่มที่ผลิตได้มี class เป็น IgG_1, IgG_2a, IgG_2b, และ IgG_3 (ตาราง 2) และสามารถ

ใช้ในการตรวจหา *A. caviae* ด้วยวิธี dot blotting ด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 2 x 10^8 ถึง 1 x 10^6 CFU/ml โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 มีความไวในการตรวจสูงที่สุด คือที่ 1 x 10^6 CFU/ml (ตาราง 2)

สรุปผลการวิจัย

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมด 7 โคลนแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มตามความจำเพาะ ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1-3 มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* แต่ละไอโซเลตแตกต่างกันไปซึ่งสามารถนำแอนติบอดีกลุ่มนี้มาจำแนกไอโซเลตของ *A. caviae* ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* แต่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Aeromonas* ชนิดอื่นๆ บางไอโซเลตด้วย และโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ที่มีความจำเพาะต่อ *Aeromonas* ทุก species สามารถนำมาใช้แยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ *A. hydrophila* ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งแสดงปฏิกิริยากับ *A. hydrophila* บางไอโซเลตที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันและโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. hydrophila* ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* ชนิดอื่นๆ ด้วย [11] สำหรับในการทดลองนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ *A. caviae* เพียง 4 ไอโซเลตเท่านั้น ทั้งนี้อาจมี *A. caviae* อีกหลายไอโซเลตที่ไม่สามารถจับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *A. caviae* ได้ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 ที่ผลิตได้ถึงแม้จะสามารถจับกับ *Aeromonas* ได้ทุก species แต่การพิสูจน์ว่าเป็น *A. caviae* นั้นยังคงมีความจำเป็นต้องทำต่อโดยการแยกเชื้อและทำการทดสอบทางชีวเคมีซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เวลานานสิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มเติมโดยเฉพาะอย่างยิ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับครอบคลุมได้ทุกไอโซเลตของ *A. caviae* ซึ่งจะสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อหรือใช้ในการจำแนก species ของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ถูกต้องและรวดเร็วต่อไป

ตาราง 1 แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกัน (*) และทดสอบความจำเพาะ

NO.	แบคทีเรีย	แหล่งที่แยกเชื้อ	สถาบัน
1	*Aeromonas caviae* 13016 (AC1)*	-	NCIMB
2	*A. caviae* 22103 (AC2)*	Stool	DMST
3	*A. caviae* 22104 (AC3)*	Rectal swab	DMST
4	*A. caviae* 22105 (AC4)*	Stool	DMST
5	*A. caviae* 22106 (AC5)*	Stool	DMST
6	*A. hydrophila* 1234 (AH1)	Carpskidney	VMARC
7	*A. hydrophila* 04082 (AH2)	-	AAHRI
8	*A. hydrophila* 2798 (AH3)	-	DMST
9	*A. hydrophila* 22095 (AH4)	Blood	DMST
10	*A. hydrophila* 22096 (AH5)	Stool	DMST
11	*A. hydrophila* 22097 (AH6)	Stool	DMST

ตาราง 1 **(ต่อ)**

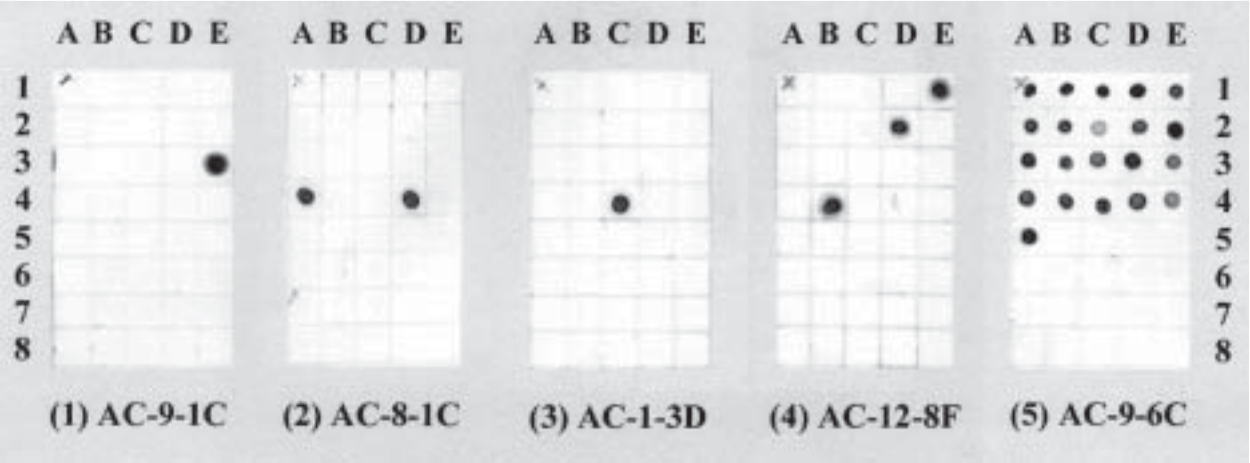
NO.	แบคทีเรีย	แหล่งที่แยกเชื้อ	สถาบัน
12	*A. hydrophila* 22098 (AH7)	Stool	DMST
13	*A. hydrophila* (AH8)	Gold fish	SWU
14	*A. sobria* 12056 (AS1)	-	NCIMB
15	*A. sobria* 1234 (AS2)	-	DMST
16	*A. sobria* 22099 (AS3)	Stool	DMST
17	*A. sobria* 22100 (AS4)	Stool	DMST
18	*A. sobria* 22101 (AS5)	Stool	DMST
19	*A. sobria* 22102 (AS6)	Stool	DMST
20	*A. veronii* 21255	-	DMST
21	*A. jandaei* 21256	-	DMST
22	*Plesiomonas shigelloides* 22107	Rectal swab	DMST
23	*P. shigelloides* 22108	Rectal swab	DMST
24	*P. shigelloides* 22109	Rectal swab	DMST
25	*Vibrio cholera*	-	DMSC
26	*V. alginolyticus* 22083	Food	DMST
27	*V. fluvialis* 22087	Stool	DMST
28	*V. harveyi* 639	-	CENTEX
29	*V. mimicus* 22089	Food	DMST
30	*V. parahaemolyticus* 22092	Food	DMST
31	*V. campbellii* 21361	-	GB
32	*V. ordalii (vib 02)*	UK	DABU
33	*V. penaeicida*	-	DMSC
34	*V. vulnificus*	Natural infected	DMSC
35	*Photobacterium damselae damsalae*	Sea Bass	DABU
36	*Photobacterium damselae* piscicida	Sea bream	UK
37	*Salmonella* Typhi	-	DMSM
38	*Salmonella Enteritidis 7108*	-	DMST
39	*Escherichia coli* ATCC 25922	-	CPF
40	*Enterobacter cloacae*	-	DMSM

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

ตาราง 2 ความจำเพาะและความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทดสอบด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry (IHC) แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี dot blotting ประมาณ 10^9 CFU/ml AC = *A. caviae*, AS = *A. sobria*, AH = *A. hydrophila* แต่ละไอโซเลตแสดงในตาราง 1 โคลนที่ขีดเส้นใต้เป็นตัวแทนโคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากแต่ละกลุ่มซึ่งใช้ในการทดสอบต่างๆ

+++ = เกิดปฏิกิริยาชัดเจนมาก
++ = เกิดปฏิกิริยาชัดเจน
– = ไม่เกิดปฏิกิริยา

Group	MAbs (isotype)	Sensitivity dot blotting (CFU/ml)	Antigen Western blotting (kDa)	IHC	Bacterial immunoreactivity (dot blotting)
1	AC-9-1C (G_2b)	1×10^6	20, 80 - 105	+++	AC1
2	AC-8-1C (G_2b)	1×10^7	20, 30 - 60	++	AC2, AC5
3	AC-1-3D (G_2a), AC-14-3F (G_3)	3×10^6	30 - 120	+++	AC4
4	AC-12-8F (G_2a)	3×10^6	20 - 150	–	AC3, AH5, AS1
5	AC-9-6C (G_1), AC-19-10C (G_2a)	2×10^8	20	–	*Aeromonas* spp.



ภาพประกอบ 1 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ของตัวแทนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ (1–5) ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1μl/จุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ กันได้แก่ (1) AC-9-1C, (2) AC-8-1C, (3) AC-1-3D, (4) AC-12-8F และ (5) AC-9-6C 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 และ *A. sobria* (D) AS1; (E) AS2

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

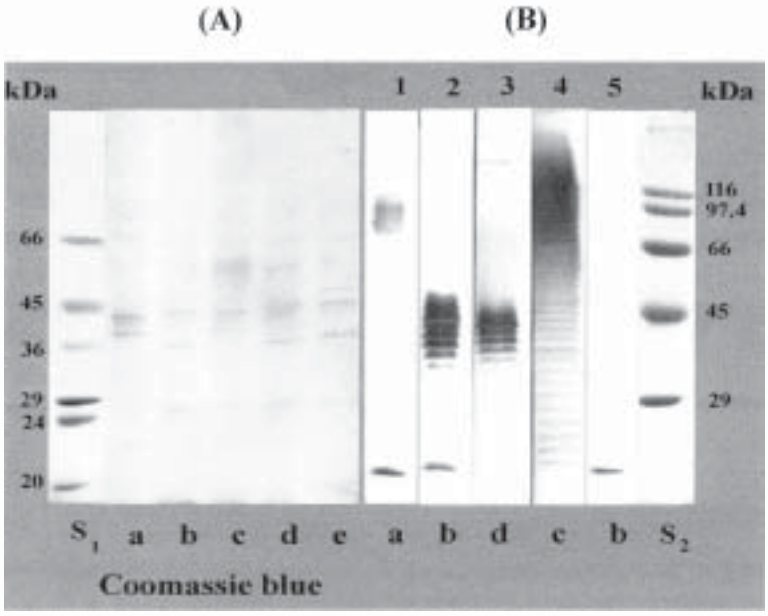
แถวที่ 4: *A. caviae* (A) AC2; (B) AC3; (C) AC4; (D) AC5; (E) *A. veronii*

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

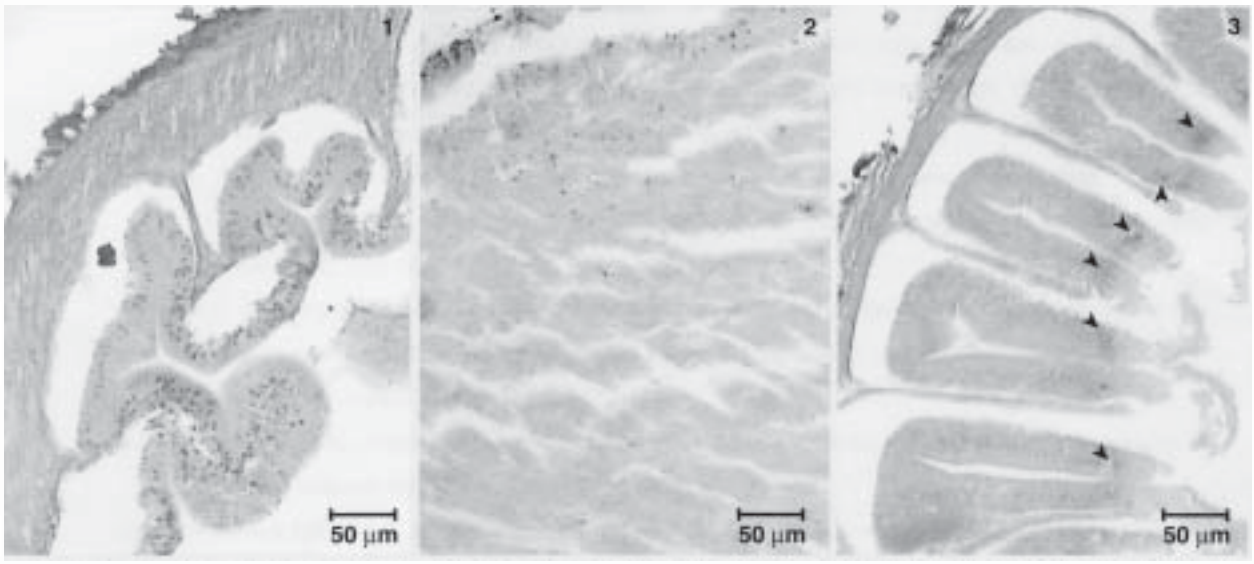
แถวที่ 6: (A) *V. alginolyticus*; (B) *V. fluvialis*; (C) *V. harveyi*; D) *V. mimicus*; (E) *V. parahaemolyticus.*

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

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



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



ภาพประกอบ 3 การตรวจสอบการติดเชื้อ *A. caviae* ด้วยวิธี immunohistochemistry ในลำไส้ของปลานิล ซึ่งถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อ AC1 นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (1) กลุ่มที่ 1 AC-9-1C ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อ AC5 ในกล้ามเนื้อของปลานิล นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (2) กลุ่มที่ 2 AC-8-1C และการตรวจสอบการติดเชื้อ AC4 ในลำไส้ของปลานิล นำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (3) กลุ่มที่ 3 AC-1-3D จุดสีเข้มและลูกศรแสดงบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี

เอกสารอ้างอิง

[1] Elcuaz, R., Pino, J.D., Fernandez, A., Bordes, A. and Lafarga, B. 1995 Peritonitis caused by *Aeromonas caviae* in a patient undergoing peritoneal dialysis, *Clinical Microbiology Newsletter*, *17*, 5-6

[2] Popoff, M. 1984 *Genus III. Aeromonas. In Bergeys manual of systematic bacteriology.* Vol. 1 Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 545 - 548

[3] Pearson, M.D., Hirono, I., Aoki, T., Miranda, R. and Inglis, V. 2000 Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa*, *Disease of Aquatic Organisms*, 40, 185-193

[4] Krkoca, H. and Boynukara, B. 2003 The characterization of protein profiles of the *Aeromonas hydrophila* and *A. caviae* strains isolated from gull and rainbow trout feces by SDS-PAGE, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 1173-1177

[5] Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y. 1996 Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish, *Aquaculture*, 145, 195-203

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

[7] Pinna, A., Sechi, L.A., Zanetti, S., Usai, D. and Carta, F. 2004 *Aeromonas caviae* keratitis associated with contact lens wear, *Ophthalmology*, 111, 348-351

[8] Khan, A.A. and Cerniglia, C. E. 1997 Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction, *Letters in Applied Microbiology*, 24, 233 - 239

[9] Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002 Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 49, 71-76

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

[11] Longyant, S., Prahkarnkaeo, K., Meevoothisom, V., Rengpipat, S. Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W., Chaivisuthangkura, P., and Sithigorngul, P. 2007 Identification of *Aeromonas hydrophila* infection with specific monoclonal antibodies, *Maejo International Journal of Science and Technology* , 01(02), 107-119

[12] Linnerborg, M., Widmalm, G., Rahman, M.M., Jansson, P., Holme, T., Qadri, F. and Albert, M.J. 1996 Structural studies of the O-antigenic polysaccharide from an Aeromonas caviae strain, *Carbohydrate Research*, 291, 165-174