



# มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ขอมอบเกียรติบัตรนี้ไว้เพื่อแสดงว่า

## บรมิณ แพนโรสง

ได้นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ

### ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ ครั้งที่ 7

ระหว่างวันที่ 1-2 เมษายน 2556 ณ อาคารนวัตกรรม ศ.ดร. สาร์ช บังศรี

ไห้ไว้ ณ วันที่ 2 เดือน เมษายน พ.ศ. 2556

(พศ.ดร.ปฐมทัศน์ จีระเดชะ)  
ผู้อำนวยการสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย  
ประสานจัดงานประชุม

(ดร.วิชชกร จารุศิริ)  
บรรณาธิการ

บทคัดย่อ  
การประชุมวิชาการระดับชาติ

# มคอว

## วิชาการ

ครั้งที่

# 7

ISBN : 978-616-296-019-2

1-2 เมษายน 2556  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

PROCEEDINGS  
การประชุมวิชาการระดับชาติ

# มคอว วิชาการ

ครั้งที่

# 7



ISBN : 978-616-296-020-8  
1-2 เมษายน 2556  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
<http://research.swu.ac.th>



สารบัญญ (ต่อ)

|   | หน้า           |
|---|----------------|
| <b>SWU7-059: BIODIVERSITY OF FRESHWATER FISH FAUNA: A SPECIAL REFERENCE TO THE SEASONAL DIFFERENCE IN KHUN DAN PRAKARNCHON DAM, NAKHON NAYOK PROVINCE, THAILAND FOR EDUCATIONAL ECOTOURISM.....</b> | <b>444-449</b> |
| Patarapong Kroeksakul, Arin Ngamniyom, Thayat Sriyapai, Jatuporn Chaosub, Unchan Tuntates, Wirongrong Duangjai, Kun Silprasit, Busaba Panyarachun   |                |
| <b>SWU7-060: การพัฒนาโปรแกรมบทเรียน เรื่อง การสื่อสารในชีวิตประจำวัน ในรายวิชาภาษาอังกฤษ สำหรับนักเรียน ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1.....</b>  | <b>450-457</b> |
| <b>THE DEVELOPMENT OF COURSEWARE ON COMMUNICATION IN DAILY LIFE UPON ENGLISH SUBJECT FOR MATTAYOMSUKSA I</b>  |                |
| ธิดาวรรณ โพธิ์ทอง   |                |
| <b>SWU7-061: การพัฒนารูปแบบการท่องเที่ยวชุมชน ตำบลบางกระสัน อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา.....</b>   | <b>458-466</b> |
| <b>THE DEVELOPMENT OF COMMUNITY- BASED TOURISM PATTERN AT BANGKRASUN, BANG PA-IN PHRANAKHON SI AYUTTHAYA PROVINCE</b>   |                |
| วันทนา เนาว์วัน, ล้ายอง ปลั่งกลาง   |                |
| <b>SWU7-062: การวิเคราะห์ระบบรับรู้สัมผัสที่ช่วยในการควบคุมการทรงทำให้นักเรียนนาฏศิลป์ไทย.....</b>  | <b>467-471</b> |
| <b>SENSORY ANALYSIS RELATED TO POSTURAL CONTROL IN THAI CLASSICAL DANCER STUDENTS: PILOT STUDY</b>  |                |
| วัลลภา นาเวศร์ตนากร, วรณศิริ แจ่มจำรูญ, อุไรพร แดนกมล, วรินทร์ กฤตยาเกียรติ   |                |
| <b>SWU7-063: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>   | <b>472-477</b> |
| <b>PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>  |                |
| นโรตม แพนไฮสง, ศิวาพร ลงยันต์, ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์, ไพศาล สิทธิกรกุล   |                |
| <b>SWU7-064: การวิเคราะห์การให้สีของพลอยสปิเนลธรรมชาติโดยเทคนิคลำไอออน.....</b>   | <b>478-486</b> |
| <b>COLOR CHARACTERIZATION OF NATURAL SPINELS BY ION BEAM TECHNIQUES</b>   |                |
| บุษบากร ศรีสถาพร, ดวงแข บุตรกุล, เสวต อินทศิริ, สมศรี สิงขรัตน์   |                |
| <b>SWU7-066: ปัจจัยด้านกรรับรู้ความเสี่ยงที่มีผลต่อพฤติกรรมการทำงานของพนักงาน ระดับปฏิบัติการในสวนอุตสาหกรรมโรจนะ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา.....</b>   | <b>487-495</b> |
| <b>FACTOR OF RISK PERCEPTION AFFECTIONS WORK BEHAVIORS OF OPERATION STAFFS IN ROJANA INDUSTRIAL PARK, PHRA NAKHON SI AYUTTHAYA</b>  |                |
| หทัยวรรณ ฉมั่งลาภ   |                |
| <b>SWU7-067 ปัจจัยทางจิตสังคมที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมอาสาสมัครของอาสาสมัครอาสาชวภาคในเขตกรุงเทพมหานคร.....</b>  | <b>496-505</b> |
| <b>PHYCHOSOCIAL FACTORS RELATED TO VOLUNTEER BEHAVIOR OF THE THAI RED CROSS YOUTH VOLUNTEERS IN BANGKOK</b>   |                |
| สุพัฒนา บุญแก้ว, อรพินทร์ ชูชม  |                |

## การประชุมวิชาการระดับชาติ “ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ” ครั้งที่ 7

จัดโดย สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย ร่วมกับ เครือข่ายวิจัยเครือข่ายอุดมศึกษาภาคกลางตอนบน  
สมาคมไฟฟ้าแสงสว่างแห่งประเทศไทย และ สมาคมวิศวกรออกแบบและปรึกษาเครื่องกลและไฟฟ้าไทย

### ที่ปรึกษา

อธิการบดี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผู้อำนวยการสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

### บรรณาธิการ

อ.ดร.วิซชากร จารุศิริ

### ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย

|                              |                               |                               |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ศ.พิเศษชงทอง จันทรางศุ       | ศ.ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์       | รศ.ดร.จำลอง โพธิ์บุญ          |
| รศ.ดร.ฉัตรดนัย จิระเดชะ      | รศ.ชาญศักดิ์ อภัยนิพัฒน์      | รศ.ดร.ดุจเดือน พันธุมนาวิน    |
| รศ.ดร.นันทนา แจงสุวรรณ       | รศ.ดร.ชนรักษ์ เมฆฉาย          | รศ.ดร.ธราพงษ์ วิฑิตานันต์     |
| รศ.ดร.บัญชา ชลาภิรมย์        | รศ.ดร.ประพัฒน์ ลักษณะพิสุทธ์  | รศ.ดร.ประวิต เอราวรรณ์        |
| รศ.ดร.ยุวดี วงษ์กระจ่าง      | รศ.ดร.รัญจวน คำวชิรพิทักษ์    | รศ.ดร.อมร เพชรสม              |
| รศ.ดร.วรรณชนก จันทชุม        | รศ.ดร.วสันต์ จันทราทิตย์      | รศ.ดร.วิทยา ยงเจริญ           |
| รศ.ดร.ศรัทธา อาภรณ์รัตน์     | รศ.ดร.สมชาย นำประเสริฐชัย     | รศ.ดร.สุรัสวดี หุ่นพยนต์      |
| รศ.ดร.สุวรรณมา จันท์ประเสริฐ | รศ.ดร.อรพรรณ พรสีมา           | รศ.สุมาลี เหลืองสกุล          |
| ผศ.ดร.แคทลียา ปัมทพรหม       | ผศ.ดร.ชนาดล คงสมบูรณ์         | ผศ.ดร.พิชัย กฤษไมตรี          |
| ผศ.จินตนา เวชมี              | ผศ.ดร.จรัส พร้อมมาศ           | ผศ.ดร.ชนะบุญย์ สัจจาอนันตกุล  |
| ผศ.ชายชาญ โพธิสาร            | ผศ.ดร.โชคชัย ชีรกุลเกียรติ    | ผศ.ดร.ประเสริฐ เรียบร้อยเจริญ |
| ผศ.ดร.วีระ สุภากิจ           | ผศ.ดร.ชเนศ ศรีสถิต            | ผศ.ดร.อรรถพล เก่าพิทักษ์กุล   |
| ผศ.นอ.ดร.สรายุทธ์ กันหลง     | ผศ.ดร.สมพร ชเนศวานิชย์        | ผศ.ดร.อุไร ไชยศรี             |
| ผศ.ดร.สมยศ วัฒนากมลชัย       | ผศ.ดร.สาวิตรี เจียมพานิชกุล   | ผศ.ดร.สุนันท์ กิตติธรรกุล     |
| ผศ.ดร.สุวิทย์ อ่องสมหวัง     | อ.ดร.วีรพัฒน์ เกียรติเฟื่องฟู | อ.ดร.วุฒิไกร งามศิริจิตต์     |
| อ.ดร.ชลกาญจน์ วงศ์ก่อทรัพย์  | อ.ดร.ชัชวาล วงศ์ชูสุข         | อ.ดร.ธีรเวช ทิตย์สีแสง        |
| อ.พญ.ปวีณา สุสันฐิตพงษ์      | อ.ดร.ปิยะพรรณ ช่างวัฒนชัย     | อ.ดร.เสกสรรค์ ทองคำบรรจง      |
| อ.ดร.พิธาน พื้นทอง           | อ.ดร.รติพร ถึงฝั่ง            | อ.ดร.ศักดิ์สิทธิ์ บุศยพลาการ  |

### ผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย

|                              |                             |                                       |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| รศ.ดร.กัญญาดา อนุวงศ์        | รศ.ดร.โกสุม จันท์ศิริ       | รศ.ดร.ชมพูนุท โกสลากร เพิ่มพูนวิวัฒน์ |
| รศ.ดร.ชาคริต ชุ่มวัฒนะ       | รศ.ดร.ประพันธ์ศิริ สุเสารัจ | รศ.ดร.พรพิมล ม่วงไทย                  |
| รศ.ดร.วิภาวี อนุพันธ์พิศิษฐ์ | รศ.ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล    | รศ.ดร.สุทิวรรณ พีรศักดิ์โสภณ          |
| รศ.ดร.อังคินันท์ อินทรกำแหง  | รศ.ดร.เรณู สุขารมณ          | ผศ.ดร.ชลวิทย์ เจียรจิตต์              |

### ผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย (ต่อ)

|                              |                              |                                  |
|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| ผศ.ดร.ประมา ศาสตรระจุจิ      | ผศ.ทพญ.ดร.นिरดา ชเนศวร       | ผศ.ดร.ศิรินุช เทียนรุ่งโรจน์     |
| ผศ.ดร.ทีฆพันธ์ เจริญพงศ์     | ผศ.ดร.วัลยา ชเนศพงศ์ธรรม     | ผศ.ดร.ปฐมทัศน์ จิระเดชะ          |
| ผศ.ดร.กิตติ สถาพรประสาธน์    | ผศ.รท.ดร.ไพบูลย์ อ่อนมั่ง    | ผศ.ดร.วรรณวิไล ไกรเพ็ชร์ เอวานส์ |
| ผศ.วัชรชัย วิริยะสุทธีวงศ์   | ผศ.ทัศนียา วังสะจันทานนท์    | ผศ.ผจงศักดิ์ หมวดสง              |
| อ.ดร.อรุษา เซาวนลิขิต        | อ.ดร.ชนาธิป สุ่มอิม          | อ.ดร.นุรีย์ วิวัฒน์วัฒนา         |
| อ.นพ.ดร.ทัศนัย ปรีตรโศกพร    | อ.ทพญ.ดร.ปรมาภรณ์ จิวพัฒนกุล | อ.ดร.รัฐภูมิ ปรีชาตปรีชา         |
| อ.ดร.จากรวรรณ พลอยดวงรัตน์   | อ.ดร.ณภัทร โพธิ์วัน          | อ.ดร.อาจรี ศุภสุทธิกุล           |
| อ.ดร.ดวงเด่น บุญปก           | อ.ดร.นพดล อินทร์จันทร์       | อ.ดร.รัชพันธุ์ เชยจิตร           |
| อ.ดร.นฤภัทร ตั้งมั่นคงวารกุล | อ.ดร.นฤมล ศิระวงษ์           | อ.ดร.ปณิธาน วนากมล               |
| อ.ดร.ลำสัน เลิศกุลประหยัด    | อ.ดร.วัฒน์ย์ โรจน์สัมฤทธิ์   | อ.ดร.อารียา เอี่ยมบุ             |
| อ.ดร.สนอง ทองปาน             | อ.ดร.วิชชากร จารุศิริ        | อ.ดร.สกล วรเจริญศรี              |
| อ.ดร.สุจิตรา ศรีสังข์        | อ.ดร.สุภัค มหาวรรค           | อ.ดร.อรพรรณ วีระวงศ์             |

### ผู้ประสานงาน

กรอุษา ศรีสุวรรณ  
จิตรลดา สีน้ำ  
สรรรควร สัตยมงคล  
อานัตต์ ปิ่นทอง  
นิพนธ์ ราชวุฒิ  
ธิดาวัลย์ โชติววรรณ  
วัชร ใจประเสริฐ

### จัดพิมพ์โดย

สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
114 ซอยสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110  
โทรศัพท์ 0-2649-5000 ต่อ 15729  
โทรสาร 0-2259-1822  
พิมพ์ครั้งที่ 1 มีนาคม 2556  
ISBN: 978-616-296-020-8

ออกแบบปก ศิริเพ็ญ พิลาคุณ  
จัดรูปเล่ม ฝ่ายสำนักพิมพ์  
สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

## SWU7-063: การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO *Pseudomonas aeruginosa*

นโรดม แพนไฮสง, ศิวาพร ลงยันต์, ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ไพศาล สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

\*Corresponding author, E-mail: n\_phaenthaisong@hotmail.com

### บทคัดย่อ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้แบคทีเรียทั้งเซลล์ จำนวน 21 ไอโซเลตผสมกันในการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว ทำการหลอมรวมเซลล์ (fusion) จากม้าม และ myeloma ทำการคัดเลือกชั้นที่ 1 และ 2 โดยวิธี dot blotting และ western blotting จากนั้นทดสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการทดสอบความไว และไอโซไทป์ (isotype) ด้วยวิธี dot blotting และ sandwich ELISA ตามลำดับ พบว่าได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการคัดเลือก (ให้ผลบวก) ทั้งหมด 10 โคลนซึ่งส่วนใหญ่มีความจำเพาะสูงและสามารถจับ *P. aeruginosa* ได้บางไอโซเลต โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี PA204-B12 และ PA208-D11 มีความจำเพาะสูง สามารถจับ *P. aeruginosa* ได้บางไอโซเลต โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้อีก 8 โคลนสามารถจับกับ *Pseudomonas* spp ได้เป็นส่วนใหญ่ หลักฐานนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือสำหรับจำแนกสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* ต่อไป

**คำสำคัญ:** *Pseudomonas aeruginosa* โมโนโคลนอลแอนติบอดี dot blotting Western blotting

### Abstract

Monoclonal antibodies (MAbs) against *Pseudomonas aeruginosa* (PA) were produced by immunization into mice with a combination of 21 isolates of the bacteria. From two fusions, after the first screening and second screening with dot blotting and Western blotting, ten strong positive immunoreactive antibody producing clones were selected and recloned (Table 1). The sensitivity and isotype of antibodies were determined by dot blotting and sandwich ELISA, respectively. MAb PA204-B12 and PA208-D11 were highly specific, it recognized some isolates of *P. aeruginosa* without cross-reactivity to other *Pseudomonas* spp. and other bacteria tested while the other eight MAbs could be used to detect most of *Pseudomonas* spp. This evidence demonstrates heterogeneity among various isolates of *P. aeruginosa*; therefore, production of MAbs against different isolates is required to develop a specific tool for detection of all isolates of *P. aeruginosa*.

**Keyword:** *Pseudomonas aeruginosa* monoclonal antibody dot blotting Western blotting



## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an aerobic, nonsporogenic, gram-negative rod. It can be found in various environments including soil, agricultural product, surface water, drinking and distilled water [1]. It has high intrinsic resistance to antibiotics [2, 3]. *P. aeruginosa* is one the most important opportunistic pathogens in animal and human. It's a common bacterial pathogen of fishes. The characteristic symptom of the disease produced by the bacteria is septicemia hemorrhage in the skin of the mouth region, opercula and ventral side of the body [4]. This microorganism infects people whose immune systems have been weakened by severe burns, cystic fibrosis (CF), immunosuppressive or cancer chemotherapy [5-7], the human immunodeficiency virus (HIV) and other diseases that cause immunosuppression [8]. It also causes the highest mortality rate of all gram-negative bacteremia cases [9]. Traditional biochemical tests were used to distinguish *P. aeruginosa* from other gram-negative rods [10]. The disadvantage of this method includes time consuming and very often confusing result due to their great diversities. Real time PCR has been used to detect *P. aeruginosa* [11] with high discrimination power. However, molecular techniques required specialist, specific instruments and limited in many laboratories. Immunological techniques are important in health management for such things as diagnosis, stereotyping, epidemiology, vaccine development, etc. Monoclonal antibodies (MAbs) are powerful tools for the rapid specific detection and not required expensive machine or specialist. The production of MAbs against *P. aeruginosa* has been reported [12]. Thus, the above mentioned MAbs could detect most of clinical isolates of *P. aeruginosa* only but are unfavorable to detect environmental isolates. The present study is an alternative method to produce monoclonal antibodies in order to use as immunological tools for identification of *P. aeruginosa* as well as its diverse strains.

## Objectives

To produce monoclonal antibodies in order to use as immunological tools for identification of *P. aeruginosa* as well as its diverse strains.

## Methods

Twenty-one isolates of heat-killed and formalin fixed *P. aeruginosa* were mixed with an equal volume of complete Freund adjuvant (1:1), and then immunized intraperitoneally in Swiss mice at 0.1 ml. They were boosted at two week intervals for three times with the above preparation in incomplete Freund adjuvant. After the fourth injection, antisera were collected and tested for their specificity by dot blotting and Western blotting. The best responded mouse was used as the spleen donor for hybridoma production. The last injection was administered 72 h before the fusion experiment. At 7 to 10 days after fusion, supernatants of growing hybridoma cells were assayed for an antibody against *P. aeruginosa* using dot blotting. Positive supernatants were tested against a battery of different bacterial species using dot blotting and western blotting. The selected hybridomas were recloned by limiting dilution. The cloned hybridomas were expanded and supernatants were future characterized.



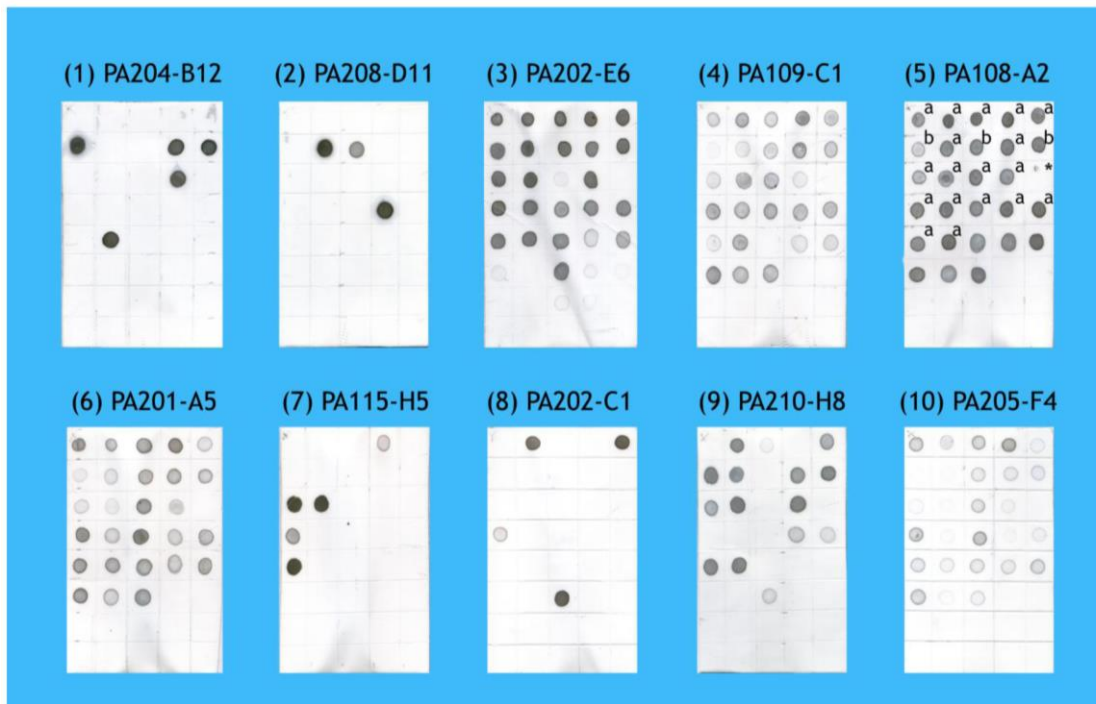
**Table 1.** Characteristic of MAbs specific to *P. aeruginosa*.

| MAbs      | Isotype           | Bacterial immunoreactivity <sup>a</sup><br>(Dot blot*)   | Detected antigen by<br>Western blot <sup>b</sup> (kDa) | Sensitivity test by<br>Dot blot (CFU/ml) |
|-----------|-------------------|--|--|--|
| PA204-B12 | IgG <sub>3</sub>  | PA6, 9, 10, 14, 22                                       | 50-106   | 1×10 <sup>6</sup>                        |
| PA208-D11 | IgG <sub>1</sub>  | PA7, 8, 19   | 25-195 (LPS)   | 2×10 <sup>5</sup>                        |
| PA202-E6  | IgG <sub>2b</sub> | PA1-12, 14, 16-22, PC, PJ, PO,<br>PSy                    | 38, 42   | 1×10 <sup>6</sup>                        |
| PA109-C1  | IgG <sub>2b</sub> | PA1-14, 16-22, PJ, PO, PP1, PSt,<br>PSy                  | 60   | 5×10 <sup>6</sup>                        |
| PA108-A2  | IgG <sub>2a</sub> | PA1-14, 16-22, PC, PJ, PO, PP1,<br>PSt, PSy              | 48   | 1×10 <sup>6</sup>                        |
| PA201-A5  | IgG <sub>2b</sub> | PA1-14, 16-22, PC, PJ, PO, PP1,<br>PSt, PSy              | 12, 20   | 5×10 <sup>6</sup>                        |
| PA115-H5  | IgM               | PA4, 11, 12, 16, 21                                      | 36-309 (LPS)   | 2×10 <sup>5</sup>                        |
| PA202-C1  | IgM               | PA2, 5, 16, PSy  | 55-195   | 2×10 <sup>5</sup>                        |
| PA210-H8  | IgM               | PA2, 3, 5, 6, 7, 9, 10-12, 14, 19-21,<br>22, PSy         | 28-58 (LPS)  | 1×10 <sup>6</sup>                        |
| PA205-F4  | IgM               | PA1-5, 8-11, 13, 14, 16-22, PC, PJ,<br>PO, PP1, PSt, PSy | 13   | 5×10 <sup>6</sup>                        |

PA = *P. aeruginosa*, PC = *P. chlororaphis*, PJ = *P. japonica*, PO = *P. oleovorans*, PP = *P. putida*, PSt = *P. stutzeri*, PSy = *P. syringae*

<sup>a</sup> The binding of antibodies to various bacteria was determined by dot blotting using bacteria at approximately 10<sup>8</sup> CFU/ml.

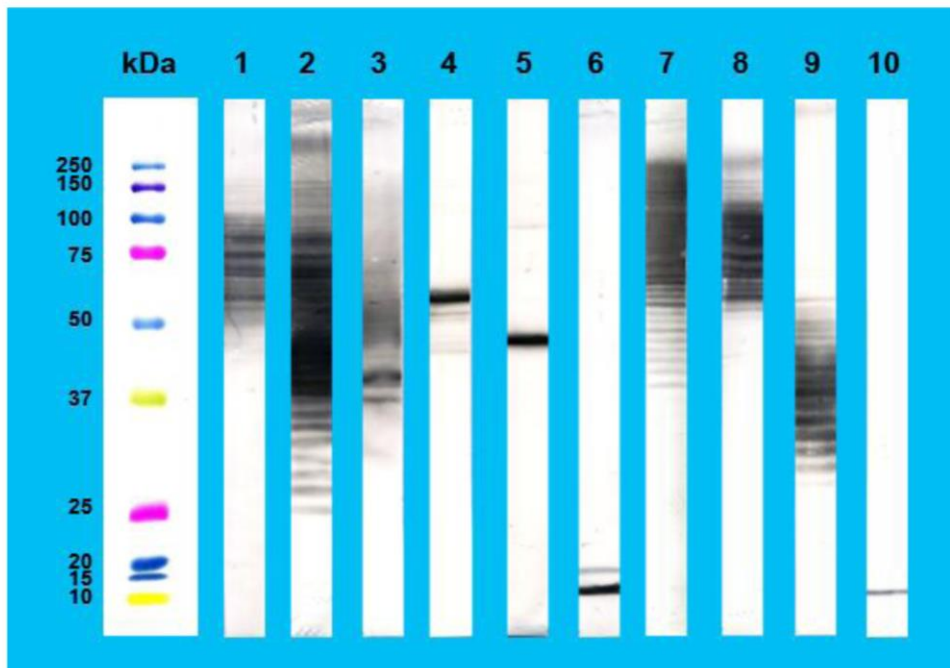
<sup>b</sup> Western blot analysis. Mixture of 6 isolates of *P. aeruginosa*: PA1, 4, 5, 7, 12, 13, 15, and 18 was separated by 15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane then treated with various MAbs.



**Figure 1.** Cross-reactions of each MAb with all 21 isolates of *P. aeruginosa* were examined by dot blotting; Heat-killed bacteria ( $10^8$  CFU/ml) were spotted onto nitrocellulose membrane (1  $\mu$ l/spot). 1-22 = *P. aeruginosa* (PA), 23 = *P. chlororaphis* (PC), 24 = *P. japonica* 1526 (PJ), 25 = *P. oleovorans* 1097 (PO), 26 = *P. putida* 23201 (PP<sub>1</sub>), 27 = *P. stutzeri* 22487 (PSt), 28 = *P. syringae* 19310 (PSy), 29 = *P. shigelloides* (PS), 30 = *P. mirabilis* (PM), 31 = *E. coli* (EC), 32 = *A. carviae* (AC), 33 = *A. hydrophila* (AH), 34 = *A. sobria* (AS), 35 = *V. cholera* (VC), 36 = *V. fluvialis* (VF), 37 = *V. harveyi* (VH), 38 = *V. minicus* (VM), 39 = *V. vulnificus* (VV), 40 = *V. parahaemolyticus* (VP), a = clinical isolate, b = environmental isolate, \* = PA15 was later re-identified as non *P. aeruginosa* by PCR.

## Results and Discussion

Ten strong positive immunoreactive antibody producing clones were selected and recloned (Table 1). Only MAb PA204-B12 and PA208-D11 were highly specific, they recognized some isolates of *P. aeruginosa* without cross-reactivity to other *Pseudomonas* spp. and other bacteria tested. Both antibodies were IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively. While the other eight MAbs could be used to detect most of *Pseudomonas* spp. (Figure 1). Four of MAbs were IgM (Table 1). In Western blot analysis MAb PA204-B12 and PA202-C1 bound to a smear band of antigen (Figure 2). MAb PA208-D11, PA115-H5 and PA210-H8 bound to a smear band of lipo-polysaccharide (LPS). MAb PA202-E6 and PA201-A5 bound to two bands of proteins. Whereas the other three MAbs bound to a single band of protein (Figure 2).



**Figure 2.** SDS-PAGE and Western blot analysis. Mixture of *P. aeruginosa*: PA1, 4, 5, 7, 12, 13, 15, and 18 was separated by 15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane then treated with MAbs PA204-B12 (1), PA208-D11 (2), PA202-E6 (3), PA109-C1 (4), PA108-A2 (5), PA201-A5 (6), PA115-H5 (7), PA202-C1 (8), PA210-H8 (9) and PA205-F4 (10).

P = prestained standard marker proteins

### Conclusion

All of the above mentioned data indicate that combination of MAb PA204-B12 and PA208-D11 were highly specific and could be used for identification of eight isolates of *P. aeruginosa* with high fidelity while the other eight MAbs could be used to detect most of *Pseudomonas* spp. This evidence demonstrates heterogeneity among various isolates for *P. aeruginosa*. Future production of MAbs against different isolates of *P. aeruginosa* is needed in order to develop immunological tools for identification of various *P. aeruginosa* isolate

## References

- [1] Botzenhart, K; & Doring, G. (1993). Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen*. Edited by M. Campa. pp. 1-18. New York: Plenum Press.
- [2] Hancock, R. E; & Woodruff, W. A. (1988) Roles of porin and beta-lactamase in beta-lactam resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*. 10: 770-775.
- [3] Poole, K; Krebs, K; McNally, C; & Neshat, S. (1993, November). Multiple antibiotic resistances in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology*. 175: 7363-7372.
- [4] Wakabayashi, H; & Egusa, S. (1972). Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 38(6): 577-587.
- [5] Grith S. J; Nathan R. K; Selander R. K; et al. (1989, June). The epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in oncology patients in a general hospital. *Journal of Infectious Diseases*. 160(6): 1030-1036.
- [6] Korvick J. A; Marsh J. W; Starzl T. E; & Yu V. L. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in patients undergoing liver transplantation: an emerging problem. *Surgery*. 109(1): 62-68.
- [7] McManus A. T; Mason A. D. Jr; McManus W. F; & Pruitt B. A. Jr. (1985, April). Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in a burn center. *European Journal of Clinical Microbiology*. 4(2): 219-223.
- [8] Cross, A. S. (1985, April). Evolving Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *European Journal of Clinical Microbiology*. 4(2): 156-159.
- [9] Bodey, G; Bolivar, R; Feinstein, V; & Jadeja, L. (1983). Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Review of Infectious Diseases*. 5: 279-293
- [10] Ghanei, H; Abeyrathne, P. D; & Lam J. S. (2007, July). Biochemical characterization of MsbA from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (37): 26939-26947.
- [11] Feizabadi, M. M; Majnooni, A; Nomanpour, B; Fatolahzadeh, B; Raji, N; Delfani, S; Habibi, M; Asadi, S; & Parvin, M. (2010). Direct detection of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with healthcare. *Infection, Genetics and Evolution*. 10: 1247-1251.
- [12] Jamasbi, R. J. (1999). Frequency and distribution of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes 03, 06, 011 in three Northwestern Ohio hospitals as determined by ELISA using specific monoclonal antibodies. *The Ohio Academy of Science*. 99 (2): 10-15.