

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตุลาคม 2556

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตุลาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ตุลาคม 2556

นโรดม แพนโรสง. (2556). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*.

ปริญญาานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์, รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล.

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* โดยใช้แบบที่เรียทั้งเซลล์ในการปลูกหมักร่วมกันให้กับหนูขาว ภายหลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ (fusion) ทั้งหมด 4 ครั้ง และทำการคัดเลือกชั้นที่ 1 และ 2 โดยวิธี dot blotting และ western blotting พบว่าได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการคัดเลือก (ให้ผลบวก) ทั้งหมด 15 โคลน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามรูปแบบความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 7 โคลน ได้แก่ PA115-H5, PA204-B12, PA205-A11, PA208-D11, PA302-A6, PA401-D1 และ PA408-D10 สามารถจับได้อย่างจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* บางไอโซเลตที่แตกต่างกัน โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ จากข้อมูลดังกล่าวหากนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 7 โคลนเหล่านี้มาใช้ในการตรวจสอบร่วมกัน (combination) จะสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ 13 ไอโซเลตจากทั้งหมด 21 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 8 โคลน ได้แก่ PA108-A2, PA109-C1, PA201-A5, PA202-C1, PA202-E6, PA205-F4, PA210-H8 และ PA403-H8 สามารถจับกับ *Pseudomonas* spp. ได้เป็นส่วนใหญ่ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *P. aeruginosa* แต่ละไอโซเลตที่รวบรวมมาจากแหล่งต่างๆ มีความหลากหลายสูง อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ ได้อย่างครอบคลุมโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสปีชีส์อื่นๆ ภายในجنัส *Pseudomonas* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนร่วมระหว่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทุกไอโซเลตต่อไป

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO *Pseudomonas aeruginosa*.



AN ABSTRACT
BY
NARODOM PHAENTHAISONG

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University

October 2013

Narodom Phaenthaisong. (2013). *Production of monoclonal antibodies specific to Pseudomonas aeruginosa*.

Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University.

Advisor Committee: Assist. Prof. Dr. Siwaporn Longyant, Prof. Dr. Paisarn Sithigomgul.

Monoclonal antibodies (MAbs) specific to *Pseudomonas aeruginosa* (PA) were generated using whole cell of bacteria for immunization. From four fusions, after the first screening and second screening with dot blotting and Western blotting, fifteen strong positive immunoreactive antibody producing clones were selected and recloned. These MAbs can be categorized into two major groups on the basis of their specificity, as follows. First, group 1 consists of seven MAbs (MAb PA115-H5, PA204-B12, PA205-A11, PA208-D11, PA302-A6, PA401-D1 and PA408-D10) that had highly specific, it recognized some isolates of *P. aeruginosa* without cross-reactivity to other *Pseudomonas* spp. and other bacteria tested. All of the above mentioned data indicate that combination of seven MAbs were highly specific and could be used for identification of 13 of 21 isolates of *P. aeruginosa* with high fidelity while Group 2 consists of eight MAbs (PA108-A2, PA109-C1, PA201-A5, PA202-C1, PA202-E6, PA205-F4, PA210-H8 and PA403-H8) that could be used to detect most of *Pseudomonas* spp. without cross-reactivity to other bacteria tested. This evidence demonstrates heterogeneity among various isolates of *P. aeruginosa*. However, this work can't still produce MAbs which specific to all isolates of *P. aeruginosa* without cross-reactivity to other *Pseudomonas* spp.; therefore, future production of MAbs against different isolates is required to develop a specific tool for detection of all isolates of *P. aeruginosa*.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ของ
นโรดม แพนไฮสง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่.....เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2556

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ที่ปรึกษาหลัก

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คิวาพร ลงยันต์)

(อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

.....ที่ปรึกษาร่วม

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คิวาพร ลงยันต์)

.....ที่ปรึกษาร่วม

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ อาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย และ คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นันทิกา คงเจริญพร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวารุณี หะยิมะสาและ คุณชลินันท์ เพ็งสุข คุณประดิษฐ์ หวังมาน คุณอรรรคพล วณิกสัมบัน พี่น้องและเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่าอย่างยิ่งอีกทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งในทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขออภิวาสนาถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุน และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอระลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยและจะนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่หมู่ทูลดองทุกตัวที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

นโรดม แพนไธสง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย	3
ความสำคัญของงานวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
สมมติฐานงานวิจัย	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ภูมิหลัง	5
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี	5
นิเวศวิทยา	6
ความสำคัญทางด้านสาธารณสุข (Public Health Significance)	7
การก่อโรค (Pathogenicity)	9
กลไกและปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค	11
การยึดเกาะและสร้างโคโลนี	11
การบุกรุกเฉพาะที่	13
การแพร่กระจายของโรคไปทั่วร่างกาย	13
วิธีการตรวจวิเคราะห์	14
โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย	21
อุปกรณ์	24
สารเคมี	24
วิธีดำเนินการวิจัย	26
การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว	26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การเตรียมแบคทีเรีย	26
การเตรียมแอนติเจน	26
การปลูกหมัคม้วน	26
การเก็บเลือดหนู	27
การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา	28
การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	28
การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting	28
การคัดเลือกขั้นที่ 2	33
การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้ามโดยวิธี Dot blotting	33
การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting	33
การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution	34
การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา	34
การศึกษาสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	36
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	36
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> โดยวิธี dot blotting	37
4 ผลการทดลอง	39
การปลูกหมัคม้วนในหนูขาว	39
การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา	44
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	44
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	45
การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี dot blotting	45

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	50
บรรณานุกรม.....	54
ภาคผนวก.....	64
ภาคผนวก ก.....	65
ภาคผนวก ข.....	68
ภาคผนวก ค.....	70
ภาคผนวก ง.....	73
ภาคผนวก จ.....	79
ภาคผนวก ฉ.....	83
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	85

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดง virulent factor ของ <i>P. aeruginosa</i>	10
2 การทดสอบทางชีวเคมีแสดงคุณสมบัติบางประการของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> เปรียบเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ ภายในجنس <i>Pseudomonas</i>	16
3 การทดสอบทางชีวเคมีแสดงตัวอย่างลักษณะต่างๆ ของ <i>P. aeruginosa</i> เปรียบเทียบกับ <i>Pseudomonas</i> spp. อื่นๆ.....	17
4 แบบที่เรียที่ใช้ในการทดลอง.....	21
5 ส่วนผสมของ SDS-PAGE.....	34
6 แสดงสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาว.....	46



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แผนผังการเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว.....	30
2 แผนผังการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา.....	31
3 แผนผังการคัดเลือกชั้นที่ 1.....	32
4 แผนผังการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ในการคัดเลือกชั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting.....	35
5 วิธีการทดลองการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	38
6 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย <i>P. aeruginosa</i> จำนวน 21 ไอโซเลต ด้วยวิธี dot blotting.....	40
7 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย <i>P. aeruginosa</i> จำนวน 21 ไอโซเลต ด้วยวิธี Western blotting.....	41
8 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย <i>P. aeruginosa</i> จำนวน 8 ไอโซเลต ด้วยวิธี dot blotting.....	42
9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย <i>P. aeruginosa</i> จำนวน 8 ไอโซเลต ด้วยวิธี Western blotting.....	43
10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting.....	47
11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting.....	48
12 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting.....	49

บทที่ 1

บทนำ

Pseudomonas aeruginosa จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Green; et al. 1974: 987-991); (Pellett; et al. 1983: 328-332) โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมที่ชื้นแฉะ ได้แก่ พื้นดิน ผลผลิตทางการเกษตร (Samadpour. 2001: 7) แหล่งน้ำขังบนผิวดิน น้ำดื่ม (Romling; et al. 1994: 1734-1738) น้ำกลั่น (Favero; et al. 1971: 836-838) สระว่ายน้ำ สปา (Cross. 1985: 156-159) และแยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาล (Jamasbi. 1999: 10-15); (Romling; et al. 1994: 1734-1738) โดยเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในสกุล *Pseudomonas* ซึ่งพบได้ร้อยละ 50 ของเชื้อที่ก่อโรคติดเชื้อในกระแสโลหิตจาก *Pseudomonas* และเป็นหนึ่งในเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญที่สุดที่พบในมนุษย์และสัตว์ ในมนุษย์พบว่า *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลัน (Driscoll; et al. 2007: 351-368) และเรื้อรัง (Elkin; & Gredde. 2003: 609-618); (Gomez; & Prince. 2007: 244-251) รวมทั้งยังพบการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำจากสาเหตุต่างๆ เช่น แผลไฟไหม้ ผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (CF) ผู้ที่มีการใช้ยากดภูมิคุ้มกันหรือการรักษามะเร็งโดยวิธีเคมีบำบัด (Samadpour. 2001: 8-12) ผู้ป่วยติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) และโรคอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุให้ภูมิคุ้มกันลดต่ำลง (Kielhofner; et al. 1992: 403-411); (Meynard; et al. 1999: 176-181); (Singer; et al. 1977: 731-742); (Steinstraesser; et al. 2005: 19); (Vostrugina; et al. 2006: 576-579); (Maschmeyer; & Braveny. 2000: 915-925); (Yamashita; et al. 2000: 107-111) การติดเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยสูงที่สุดในบรรดาแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Cachia; & Hodges. 2003: 141-168) อีกทั้งยังเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยมะเร็ง ผู้ป่วยแผลไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ และผู้ป่วย cystic fibrosis มีอัตราการตายสูงขึ้นอีกด้วย (Samadpour. 2001: 7-12) การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในสัตว์นั้นพบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคแผลตามลำตัว (ulcerative disease) ในปลา และเป็นสาเหตุให้ปลาติดเชื้อราแทรกซ้อนต่อไป โดยปลาที่ติดเชื้อมักเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต ทำให้เลือดออกตามผิวหนังบริเวณปาก แผ่นปิดเหงือก และบริเวณด้านหลังของลำตัว (Hossain; et al. 2006: 77-78) ปลาที่มักพบบ่อยว่าเป็นโรคนี้ได้แก่ ปลาดุก ปลานู ปลาทอง และปลาสวยงามต่างๆ (Noga. 2000: 36616-36622)

การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลและฟาร์มเลี้ยงปลา ตลอดจนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจำเป็นต้องทราบชนิดของแบคทีเรียเพื่อการรักษาและการป้องกันที่เหมาะสม เนื่องจากเชื้อมีความดื้อต่อยาปฏิชีวนะทั่วไป ดังนั้นการรักษาต้องใช้ยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* (anti-pseudomonal antibiotic) ในอดีตได้มีการคิดค้นพัฒนาวิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. aeruginosa* โดยใช้

เทคนิคทางจุลชีววิทยาหลายวิธี เช่น ทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในสภาวะต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Palleroni. 2005: 323-379) การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Patzet; et al. 1986: 45-49) ประกอบกับการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ ของเชื้อเป็นต้น (Ghanei; et al. 2007: 26939-26947); (MacIntyre; et al. 1986: 675-686); (Palleroni; 2005: 323-379) พบว่าการตรวจโดยใช้วิธีเหล่านี้ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลา และแรงงานค่อนข้างมาก และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ ทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปอย่างล่าช้า ในปัจจุบันจึงได้มีผู้พัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (Hassan; et al. 2012: 90-98) การตรวจหาลำดับของยีนบริเวณ 16S rRNA (Anzai; et al. 2000: 1563-1589); (Palleroni; 2005: 323-379) การใช้ Multilocus sequence analysis (MLSA) หรือ Multilocus sequence typing (MLST) (Curran; et al. 2004: 5644-5649); (Johnson; et al. 2007: 3707-3712); (Khan; et al. 2008: 6194-6205) และการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค Real time PCR อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูง ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ อีกทั้งขั้นตอนต่างๆ ในการตรวจสอบจำเป็นต้องอยู่ในห้องปฏิบัติการ และต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ

นอกจากนี้ได้มีการนำความรู้ทางภูมิคุ้มกันวิทยามาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียโดยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies; MAbs) ที่มีความจำเพาะต่อองค์ประกอบต่างๆ ของแบคทีเรีย โดยคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออีพิโทป (epitope) ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียที่มีลักษณะใกล้เคียง ทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงสามารถจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้ ซึ่งมีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *Vibrio harveyi* (Phianphak; et al. 2005: 161-168), *Escherichia coli* (He; et al. 1996: 3325-3332); (Rivera-Betancourt; & Keen. 2000: 4124-4127) และ *Bacillus cereus* (Charni; et al. 2000: 2278-2281) การผลิตและใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนกแบคทีเรียโดยสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Comamonas acidovorans*, *Cytophaga johnsonae* และ *Aeromonas hydrophila* ในน้ำได้ (Faude; & Hofle. 1997: 4534-4542) เป็นต้น

สำหรับการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นได้มีรายงานการผลิตจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* ที่อยู่ในรูปแบบ formalin-fixed เป็นแอนติเจน (Jamashbi. 1999: 10-15); (Lam; et al. 1987a: 2854-2856; 1987b: 1051-1057; 1992: 2178-2184) พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ และโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนต่างๆ ในแบคทีเรียชนิดอื่น แต่พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่สำคัญทางคลินิกเท่านั้น และยังไม่สามารถใช้ในการแยกสายพันธุ์ที่พบในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. aeruginosa* โดยปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรียทั้งเซลล์ แล้วคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* spp. หรือแบคทีเรียแกรมลบ

และแกรมบวกชนิดอื่นๆ ซึ่งคาดว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือสำหรับพิสูจน์ทราบและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ หรืออาจปนเปื้อนในเครื่องสำอาง (สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2555: online) เพื่อช่วยในการคัดกรองเชื้อที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และตรวจสอบสินค้าประเภทเครื่องสำอางนำเข้าหรือส่งออกที่สำคัญ อีกทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งนำไปสู่การดูแลรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ถูกต้อง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้อาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจแบบแถบสี (strip test) ที่สามารถใช้ตรวจและรู้ผลรวดเร็วภายใน 15 นาที โดยไม่ต้องใช้เครื่องมืออื่นๆ เพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยตนเองต่อไป (Sithigorngul; et al. 2006: 101-106; 2007a: 256-264; 2007b: 193-199)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อนำมาใช้จำแนก *P. aeruginosa*
2. เพื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจเชื้อ *P. aeruginosa* จากตัวอย่างด้วยวิธี dot blotting

ความสำคัญของงานวิจัย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพิสูจน์ทราบและวินิจฉัยการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในมนุษย์ตลอดจนปศุสัตว์ และสามารถประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้เพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจแบบแถบสีต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เตรียมแบคทีเรียที่ใช้เป็นแอนติเจนสำหรับใช้ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว
2. ผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ ทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ
3. ตรวจสอบสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจ *P. aeruginosa* โดยวิธี dot blotting

สมมติฐานงานวิจัย

เทคนิคโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies technique) เป็นแนวทางการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อบริเวณที่เป็นลักษณะเฉพาะของโมเลกุลอีพิโทปที่หลากหลายของเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งมีสมบัติเป็นแอนติเจนที่มีทั้งลักษณะเฉพาะแต่ละสายพันธุ์หรือมีลักษณะร่วมกันในแต่ละชนิดของแบคทีเรีย ดังนั้นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออีพิโทปดังกล่าวได้จึงเป็นการสร้างเครื่องมือถาวรในการวินิจฉัยโมเลกุลเหล่านั้นและทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *P. aeruginosa* จากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในตัวอย่างต่างๆ ได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ภูมิหลัง

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

P. aeruginosa เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ไนจีเนส *Pseudomonas* มีลักษณะเป็นรูปท่อนหรือโค้งเล็กน้อย ขนาดประมาณ $0.5\ \mu\text{m} \times 2.5\ \mu\text{m}$ ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยโพลาร์แฟลกเจลลา (polar flagella) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าโดยการหมุนคล้ายลักษณะของใบพัดเรือหรือการหมุนเป็นเกลียว (screw-like motion) นอกจากนี้โพลาร์แฟลกเจลลายังมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรค โดยการยึดเกาะกับองค์ประกอบบนเซลล์เยื่อบุ (epithelium cell) (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91) สำหรับผนังเซลล์ด้านนอก (outer membrane) ของเชื้อ *P. aeruginosa* ประกอบด้วย lipopolysaccharide (LPS) มีโครงสร้างคล้ายแบคทีเรียในแฟมิลี Enterobacteriaceae แต่มีสารเคมีบางหมู่ที่แตกต่างกันเท่านั้น ส่วนของ polysaccharide side chain ที่ยื่นออกจากผนังเซลล์ด้านนอกเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับความจำเพาะทาง serology อีกทั้งยังมีความไวต่อ bacteriophage และ bacteriocin หรือ pyocin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด (antimicrobial peptide) เชื้อ *P. aeruginosa* บางสายพันธุ์มีการสร้างชั้นเมือก (slime layer) รอบนอกอีกชั้นซึ่งอาจรอบเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ก็ได้ นอกจากนี้ที่ผิวเซลล์ของเชื้อ *P. aeruginosa* ยังมีพิล (pili) ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญอีกรูปแบบหนึ่งที่ใช้สำหรับการเคลื่อนที่และยึดเกาะที่เซลล์เยื่อบุของโฮสต์ (Anzai; et al. 2000: 1563-1589); (Cryz; et al. 1984: 317-351); (MacIntyre; McVeigh; & Owen. 1986: 675-686) พิลที่พบใน *P. aeruginosa* ทำให้เกิดการเคลื่อนที่แบบ twitching โดยเกิดจากสมบัติของพิลที่สามารถหดตัวจนทำให้เกิดการกระตุกและเคลื่อนที่ได้ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์แบคทีเรียอื่นๆ ที่พิลไม่มีบทบาทเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ (Mattick. 2002: 289-314)

สำหรับลักษณะโคโลนีของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยทั่วไปมีลักษณะเป็นมันวาว (glossy colonies) กลม มีขนาดค่อนข้างเล็ก หลังจากบ่มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria agar (LA) พบว่าโคโลนีส่วนใหญ่ผลิตเม็ดสี (pigment) ที่มีสีเขียวน้ำเงินที่มีความเป็นกลางหรือด่างซึมออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ สีที่มีโครงสร้างเป็น phenazine เรียกสีชนิดนี้ว่า pyocyanin สีอื่นๆ ที่สามารถสร้าง ได้แก่ pyoverdin (สีฟลูออเรสเซนต์), pyorubin (สีแดง) และ pyomelanin (สีน้ำตาล) เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ไม่ผลิตเม็ดสี (pigment) มีน้อยมาก ประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต (isolate) ที่ผลิตเม็ดสีสีแดงมี 5 เปอร์เซ็นต์ (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537: 258-279)

2.1 นิเวศวิทยา

เชื้อ *P. aeruginosa* ดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจน สามารถใช้พลังงานจากแหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนจากสารอาหารทั่วไปโดยไม่จำเป็นต้องอาศัย growth factor สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือได้สูง แต่ไม่ทนต่อสภาวะที่แห้ง (desiccation) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-42 องศาเซลเซียส (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537: 258-279) และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถแยกได้จากดิน น้ำ พืช สัตว์ และคน เนื่องจากเชื้อมีความสามารถทนต่อสภาพอากาศที่แตกต่างกันได้ดี และต้องการอาหารเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041) สามารถอาศัยอยู่ในน้ำได้นานถึง 300 วัน แม้แต่ในน้ำกลั่น เนื่องจากเชื้อสามารถใช้อะซิเตท (acetate) หรือคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากอากาศเป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนีย (NH_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537: 258-279) นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* ยังมีความสามารถในการปรับตัวเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ โดยการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์กลับไปกลับมา (phenotypically change) จากที่ไม่สร้างเมือก (non-mucoid *P. aeruginosa*) ให้สามารถสร้างเมือก (mucoid *P. aeruginosa*) ได้ อีกทั้งยังสามารถผลิต alginate ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่หลังสู่ภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide) ในปริมาณสูงสำหรับใช้สร้างเป็น biofilm เพื่อส่งเสริมการยึดเกาะพื้นผิว และกักเก็บสารอาหารที่อยู่ในแหล่งน้ำหรือตามสิ่งแวดล้อมต่างๆ (Boyd; & Chakrabarty. 1995: 162-168)

เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Green; et al. 1984: 987-991); (Pellett; et al. 1983: 328-332) โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมที่เปียกชื้น ได้แก่ ดิน ผลผลิตทางการเกษตร (Samadpour. 2001: 7) น้ำที่ขังบนผิวหน้าดิน น้ำดื่ม (Romling; et al. 1994: 1734-1738) น้ำกลั่น (Favero; et al. 1971: 836-838) สระว่ายน้ำ และสปา (Cross. 1985: 156-159) และแยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาล (Jamasbi. 1999: 10-15); (Romling; et al. 1994: 1734-1738) สำหรับในมนุษย์มักพบบริเวณชอกฟกช้ำ แผล ขา ในลำคอ อูจจาระ (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537: 258-279) ฝีเย็บ รักแร้ และหู (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041) นอกจากนี้สภาพแวดล้อมในโรงพยาบาลโดยเฉพาะบริเวณที่มีความชื้นสูงมักเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของเชื้อได้ดี เช่น อุปกรณ์เครื่องช่วยหายใจ สารน้ำต่างๆ ยาน้ำ รวมทั้งน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิด อ่างล้างมือ ไม้ถูพื้น หรือแม้กระทั่งในอาหาร ดังนั้นเชื้อ *P. aeruginosa* จึงเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล อีกทั้งยังเป็นหนึ่งในเชื้อประจำถิ่นบนร่างกายมนุษย์ อย่างไรก็ตามในคนที่แข็งแรงความชุกของเชื้อมักจะมีค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลความชุกของเชื้อจะเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะบนผิวหนังผู้ป่วยไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก ผู้ป่วยที่ใส่เครื่องช่วยหายใจ ในทางเดินอาหารของผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด หรือบริเวณต่างๆ ของผู้ป่วยที่

ได้รับยาปฏิชีวนะ ซึ่งการมีอยู่ของเชื้อนี้ตามบริเวณต่างๆ ของผู้ป่วยมักจะนำไปสู่การติดเชื้อได้ในที่สุด (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041)

3.1 ความสำคัญทางด้านสาธารณสุข (Public Health Significance)

P. aeruginosa เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญของการติดเชื้อที่เกิดขึ้นในโรงพยาบาล (nosocomial infection) (Baron; & Jones. 1995: 141-151); (Pollack. 1984: S617-S626); (Yamashita; et al. 2000: 107-111) สามารถพบได้บ่อยในน้ำและแหล่งน้ำตามสถานที่พักผ่อนต่างๆ เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic) ที่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (immunocompromised individuals) อันเนื่องมาจากการใช้ยากดภูมิคุ้มกันและการรักษาด้วยเคมีบำบัด ในผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้รุนแรง (Vostrugina; et al. 2006: 576-579) หรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) หรือโรคอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุให้ภูมิคุ้มกันต่ำ (Cross. 1985: 156-159) เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรัง (chronic infection) ได้ทั้งในผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (Pujana; et al. 1999: 2071-2073) และผู้ป่วยติดเชื้อ HIV (Asboe; et al. 1998: 1771-1775) ส่วนในสถานพยาบาลสามารถพบเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ในห้องผ่าตัด (Cross. 1985: 156-159) เครื่องมือสำหรับการฟอกเลือด (Krothapalli; et al. 1982: 1862-1863); (Vanholder; Vanhaeke; & Ringoir. 1992: 19-24) ยาหยอดตา และคอนแทคเลนส์ (Cross. 1985: 156-159) ซึ่งนับเป็นหนึ่งในตัวกลางสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมตามสถานพยาบาล อุปกรณ์ต่างๆ ภายในสถานพยาบาล ก๊อกน้ำ อ่างล้างมือ ท่อพักน้ำ และของเล่นเด็กลอยน้ำ (Ayliffe; et al. 1974: 578-581); (Kolmos; et al. 1993: 11-21); (Ferroni; et al. 1998: 301-307); (Buttery et al. 1998: 509-513) นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* ยังสามารถปนเปื้อนได้ตามสายสวนท่อปัสสาวะ (Urinary catheters) และสายสวนหลอดเลือดดำ (intravenous lines) (Edgeworth; Treacher; & Eykyn. 1999: 1421-1428) และมักเป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบเนื่องมาจากการใช้เครื่องช่วยหายใจ (Ventilator-associated pneumonia; VAP) (Bergmans; et al. 1998: 1053-1058)

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* มักส่งผลให้มีอัตราการตายสูงขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง แผลไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ และผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (Bodey; et al. 1983: 279-293); (Buttery; et al. 1998: 509-513) จากการศึกษาการใช้ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่าการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบในผู้ป่วยที่รักษาตัวในแผนกผู้ป่วยหนัก (intensive care units; ICUs) มีอัตราการดื้อต่อยา piperacillin และ ceftazidime สูงที่สุดเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่อยู่แผนกผู้ป่วยนอกหรือห้องอื่นๆ (Fridkin; et al. 1999: 245-252) การศึกษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลสวิสส์ (Swiss hospitals) พบว่าการติดเชื้อในแผนกผู้ป่วยหนักมีแนวโน้มที่สูงขึ้นกว่าแผนกอื่นๆ ในโรงพยาบาล (Pittet; et al. 1999: 37-42) สาเหตุการติด

เชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นนั้นส่วนหนึ่งมาจากปัจจัยต่างๆ ที่เอื้อต่อการก่อโรค เช่น ระยะเวลาการเข้ารักษาตัวในโรงพยาบาล อายุ และผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal diseases) (Olson; et al. 1984: 808-816) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวส่งผลให้ผู้ป่วยหลังผ่าตัดมีโอกาสติดเชื้อที่ปอด (nosocomial pneumonia) เพิ่มขึ้น (Crabtree; et al. 1999: 706-709) นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* ยังเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบที่หูชั้นนอก (external otitis) ที่เรียกว่า swimmer's ear และยังพบว่าการผ่าตัดคัลยกรรมบนใบหน้ายังมีความเสี่ยงที่จะเกิดการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ได้อีกด้วย (Samadpour. 2001: 7-18)

เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เปียกชื้น ดังนั้นการแพร่ระบาดของเชื้ออาจเกิดขึ้นได้จากการปนเปื้อนในของเหลว และเครื่องมือสำหรับการฟอกเลือด (Krothapalli; et al. 1982: 1862-1863); (Vanholder; Vanhaeke; & Ringoir. 1992: 19-24) ซึ่งกรณีผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องฟอกเลือดนั้น การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในเยื่อช่องท้อง (peritonitis) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยที่สุด นอกจากนี้มีรายงานการพบการปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa* ในยาหยอดตา ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อที่ตาได้ อย่างไรก็ตามผู้ป่วยมักได้รับบาดเจ็บอย่างใดอย่างหนึ่งเกิดขึ้นก่อนที่จะเกิดการติดเชื้อขึ้น (Cross. 1985: 156-159) เช่น เกิดการฉีกขาดหรือเป็นแผลในกระจกตา จากนั้นเมื่อมีการสัมผัสกับน้ำที่ปนเปื้อนหรือน้ำยาคอนแทคเลนส์ที่อาจมีการปนเปื้อนตั้งแต่กระบวนการผลิตจึงสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่ตาได้ในที่สุด นอกจากนี้ biofilm ที่เชื้อ *P. aeruginosa* สร้างขึ้นยังเพิ่มความสามารถในการสร้างโคโลนีบนคอนแทคเลนส์และเป็นต้นเหตุให้กระจกตาเกิดการอักเสบ (keratitis) (Simmons; Tomlinson; & Seal. 1998: 860-866)

รายงานการระบาดของเชื้อ *P. aeruginosa* ในโรงพยาบาลมักพบว่าอุปกรณ์เครื่องช่วยหายใจ กล้องส่องอวัยวะภายใน (endoscopes) การใส่เครื่องกระตุ้นหัวใจ (pace makers) เข้าเส้นเลือดดำ น้ำยาฆ่าเชื้อพลาสติกปิดแผล เครื่องมือ suction ในห้องผ่าตัด อาหารเหลวและสระน้ำธาราบำบัด (hydrotherapy pool) เป็นแหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญ ในขณะที่การส่งผ่านเชื้อระหว่างผู้ป่วยไปยังผู้ป่วย (cross-transmission) โดยผ่านมือของบุคลากรทางการแพทย์นั้นมีโอกาสเกิดขึ้นน้อย (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035) เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถแยกได้จากแหล่งน้ำต่างๆ ภายในสถานพยาบาล เช่น ระบบน้ำทางทันตกรรม (dental waterlines) ก็สามารถเป็นแหล่งปนเปื้อนของเชื้อได้ (Barbeau; Gauthier; & Payment. 1998: 1019-1028) และ biofilms ที่สร้างออกมาในสภาพแวดล้อมเหล่านี้จะช่วยป้องกันเชื้อจากยาปฏิชีวนะ หรือสารต้านจุลชีพ (biocides) และส่งเสริมการกักเก็บสารอาหารทำให้เชื้อที่อยู่ภายใน biofilm นี้สามารถยืดเกาะและทนอยู่ได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ก็กอน้ำตามแผนกผ่าตัดเด็ก (pediatric surgical unit) (Ferroni; et al. 1998: 301-307) ห้องผู้ป่วยหนักศัลยกรรมระบบประสาท (neurosurgery ICU) (Bert; et al. 1998: 53-62) แผนกผู้ป่วยที่มีแผลไฟไหม้ (Ayliffe; et al. 1974: 578-581); (Kolmos; et al. 1993: 11-21) และแผนกผู้ป่วยโรค cystic fibrosis (Bobhammer; et al. 1995: 261-274) ยังสามารถเป็นแหล่งปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้อีกด้วย

นอกจากการติดเชื้อในโรงพยาบาลแล้วการติดเชื้อ *P. aeruginosa* นอกโรงพยาบาลยังเป็นเรื่องปกติที่สามารถเกิดขึ้นได้ โดยผลที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อนี้ ได้แก่ รูขุมขนอักเสบ (folliculitis) หูชั้นนอกอักเสบ (external otitis) การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (Urinary tract infection) โดยสถานที่ที่สามารถก่อให้เกิดการแพร่ระบาดได้ ได้แก่ อ่างน้ำวน (whirlpools) (Highsmith; et al. 1985: 407-412); (Penny. 1991: 535-542) ก๊อกน้ำ อ่างน้ำร้อน เครื่องเล่น water slides และทะเลสาบน้ำจืด จากการวิเคราะห์น้ำที่ใช้ดื่มใน 7 ชุมชนพบว่า *Pseudomonas* เป็นส่วนหนึ่งในกลุ่มของแบคทีเรียทั่วไปที่พบมากในน้ำดื่มมากกว่าตามแหล่งน้ำทั่วไป (Armstrong; et al. 1981: 277-283) โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถเกิดได้จากการใช้แหล่งน้ำตามสถานที่พักผ่อน โดยมีรายงานพบว่าการใช้อ่างน้ำร้อนสามารถทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อได้ (Cross. 1985: 156-159); (Herwaldt; et al. 1991: 1-21); (Kramer; et al. 1996: 1-33); (Levine; Stephenson; & Craun. 1990: 1-13) เช่น การเกิดผื่นที่มีสาเหตุมาจาก *P. aeruginosa* ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากการใช้อ่างน้ำวนและสปาที่อยู่ในเขตพื้นที่ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Herwaldt; et al. 1991: 1-21); (Kramer; et al. 1996: 1-33); (Levine; Stephenson; & Craun. 1990: 1-13) การระบาดของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ทำให้เกิดผื่นและการอักเสบของหูชั้นนอกยังสามารถเกิดขึ้นได้จากการรับเชื้อจากแหล่งน้ำตามบึงหรือทะเลสาบน้ำจืดในประเทศเนเธอร์แลนด์ (Van Asperen; et al. 1995: 1407-1410) และฝรั่งเศสได้อีกด้วย (Ferley; et al. 1989: 198-205)

4.1 การก่อโรค (Pathogenicity)

เชื้อ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและในสัตว์ เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มีความรุนแรงสูงชนิดหนึ่ง สามารถสร้างสารพิษและเอนไซม์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค (virulence factor) ได้หลายชนิด (ตาราง 1) มักพบการติดเชื้อแบคทีเรียนี้ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของภูมิคุ้มกันบางอย่างโดยหนึ่งเกิดขึ้นก่อนการติดเชื้อ เช่น ผิวหนังหรือเยื่อถูกทำลาย มีการสอดใส่แผลปลอมเข้าสู่หลอดเลือด การใส่ท่อช่วยหายใจ หรือในผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia) ภาวะ hypogammaglobulinemia การขาดคอมพลีเมนต์ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันหรือแม้แต่ผู้ป่วยเอดส์ (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041) โดยทั่วไปเชื้อ *P. aeruginosa* มักไม่มีอันตรายหรือมีอันตรายน้อยมากกับคนที่มีสุขภาพแข็งแรง แต่จะส่งผลอย่างมากกับผู้ที่ระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอ โดยการติดเชื้อขึ้นอยู่กับความไวในการเกิดโรคของแต่ละคน ตัวอย่างเช่น ผู้ประสาบภัยไฟไหม้จนทำให้สูญเสียผิวหนังชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังหรือสูญเสียกลไกการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมด่านแรก (first-line defense) การสูญเสียชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังจะทำให้เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถสัมผัสและเข้าหลอดเลือดสู่เส้นเลือด ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตได้ (Samadpour. 2001: 12-13)

ตาราง 1 แสดงปัจจัยที่ก่อความรุนแรงของโรค (virulent factor) ของเชื้อ *P. aeruginosa*

Virulent factor	Gene	อ้างอิง
Alkaline protease	<i>aprA</i>	Duong; et al. (2001): 147-158.
Unknown	<i>aprX</i>	Duong; et al. (2001): 147-158.
Haem-binding protein	<i>hasA</i>	Letoffe; et al. (1998): 1223-1234.
Hemolytic phospholipase C	<i>plcH</i>	Ostroff; et al. (1990): 5915-5923.
Non-hemolytic phospholipase C	<i>plcN</i>	Ostroff; et al. (1990): 5915-5923.
Alkaline ceramidase	<i>P A0845</i>	Okino; et al. (1999): 36616-36622.
Exotoxin A (ADP-ribosyltransferase)	<i>exoA</i>	Filloux; et al. (1998): 68-72.
Aminopeptidase	<i>P A2939</i>	Braun; et al. (1998): 3467-3469.
Chitin-binding protein	<i>cbpD</i>	Folders; et al. (2000): 1257-1263.
Alkaline phosphatase	<i>lapA</i>	Ball; et al. (2002): 475-485.
Elastase	<i>lapB</i>	Filloux; et al. (1998): 68-72.
Lipase	<i>lipA</i>	Martinez; et al. (1998): 1235-1246.
Protease IV	<i>prpL</i>	Wilderman; et al. (2001): 5385-5394.
Staphylolytic protease	<i>lasA</i>	Filloux; et al. (1998): 68-72.
Cytotoxin	<i>exoU</i>	Cornelis; & Van (2000): 735-774.
ADP-ribosyltransferase ExoT	<i>exoT</i>	Cornelis; & Van (2000): 735-774.
ADP-ribosyltransferase ExoS	<i>exoS</i>	Cornelis; & Van (2000): 735-774.
Adenylate cyclase	<i>exoY</i>	Cornelis; & Van (2000): 735-774.
Chitinase	<i>chiC</i>	Folders; et al. (2001): 1257-1263.

สาเหตุของการเกิดโรคในคนเนื่องจากร่างกายผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีไปต่อต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนี้ไม่สามารถไปกำจัดเชื้อได้ แต่จะรวมเป็น immune complex กระตุ้น inflammatory mediator และ cytokine ต่างๆ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงตามอวัยวะต่างๆ ตัวอย่างเช่น เชื้อ *P. aeruginosa* บางไอโซเลตสามารถทำให้เกิดการบาดเจ็บอย่างเฉียบพลันของเยื่อปอดที่ปอด (Wiener-Kronish; et al. 1993: 1661-1669); (Faure; et al. 2003: 2) หรือส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ parenchyma ของปอด ส่งผลให้เกิดโรคและลดประสิทธิภาพการทำงานของปอด (Caballero; et al. 2000: 669-674) จากรายงานของ แมนเฟรดีและคนอื่นๆ ในปี ค.ศ. 2000 (Manfredi; et al. 2000: 111-118) พบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และพบบ่อยมากขึ้นใน advanced HIV disease ได้แก่ ผู้ป่วยโรคเอดส์ (AIDS) ที่มีภาวะเม็ดเลือดขาว CD4 ต่ำ หรือมีการใส่สายสวนท่อปัสสาวะร่วมด้วย เชื้อนี้สามารถแพร่กระจายทางกระแสโลหิตไปยังระบบทางเดินปัสสาวะ ดังนั้นจึงสามารถตรวจเชื้อนี้ได้ทั้งทางเลือดและในปัสสาวะของผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วย AIDS นอกจากนี้เชื้อ *P. aeruginosa* จะเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดโรคแก่มนุษย์แล้ว พบว่าการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ยังก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลา ซึ่งก่อให้เกิดโรคแผลตามลำตัว (ulcerative disease) ของปลา และเป็นสาเหตุให้ปลาติดเชื้อราแทรกซ้อนต่อไป โดยปลาที่ติดเชื้อมักเกิดภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต ทำให้เลือดออกตามผิวหนังบริเวณปาก แผ่นปิดเหงือก และบริเวณด้านหลังของลำตัว (Samadpour. 2001: 7-18) ปลาที่มักพบบ่อยว่าเป็นโรคนี้ได้แก่ ปลาดุก ปลานู ปลาช่อน และปลาสวยงามต่างๆ (Noga. 2000: 36616-36622)

5.1 กลไกและปัจจัยที่ส่งผลต่อความรุนแรงของโรค

เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ในหลายระบบของร่างกายโดยเฉพาะระบบทางเดินหายใจ ซึ่งมักเป็นปัญหาในผู้ป่วย cystic fibrosis โดยการติดเชื้อที่สำคัญและรุนแรงที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินหายใจหรือการติดเชื้อในระบบอื่นๆ ที่มักพบภาวะติดเชื้อในกระแสโลหิต (sepsis) ร่วมด้วย กลไกการก่อโรคของเชื้อ *P. aeruginosa* สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ ระยะที่ 1 เป็นการยึดเกาะ (attachment) และการสร้างโคโลนี (colonization) ระยะที่ 2 เป็นการบุกรุกเฉพาะที่ (localized invasion) และระยะที่ 3 เป็นระยะที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของโรคไปทั่วร่างกาย (systemic infection) (สมเกียรติวัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041)

1.5.1 การยึดเกาะและสร้างโคโลนี

หลังจากร่างกายได้รับเชื้อจะมีการสร้างโคโลนีขึ้นที่เยื่อของระบบทางเดินหายใจ (respiratory epithelium) ซึ่งหากผู้ป่วยอยู่ในสภาวะที่เอื้อต่อการเกิดโรค ได้แก่ ผู้ป่วย cystic fibrosis ผู้ป่วยที่ใช้เครื่องช่วย

หายใจ (mechanical ventilation) ผู้ป่วยที่ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง ป่วยเป็นโรคปอด (Samadpour. 2001: 7-18) หรือมีอาการบาดเจ็บของเซลล์ (cellular injury) เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการติดเชื้อร่วมด้วยยังเป็นปัจจัยส่งเสริมให้การยึดเกาะของเชื้อดีขึ้น (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041) เชื้อ *P. aeruginosa* มีโครงสร้างสำคัญที่มีส่วนช่วยในการลุกล้ำเข้าสู่ร่างกายได้แก่ แฟลกเจลลาและพิลไ ซึ่งปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคที่อยู่บนผิวเซลล์ (cell surface virulence factors) รูปแบบหนึ่งของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีบทบาทในการเคลื่อนที่ไปยังเซลล์เยื่อและยึดเกาะเพื่อเตรียมผ่านข้ามสิ่งกีดขวางทางสรีรวิทยา (physiological barrier) ต่อไป

การยึดเกาะในเบื้องต้นนั้นแฟลกเจลลาและพิลไจะไปจับที่บริเวณ asialo-GM1 receptor ของเซลล์เยื่อ จากนั้นเกิดการจับกันระหว่างแฟลกเจลลากับ Toll-like receptor ชนิด TLR5 และ TLR2 ทำให้เกิดการกระตุ้นให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์และหลั่ง IL-8 (interleukin 8) ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลัน นอกจากนี้ยังมี LPS ที่มีบทบาทคล้ายกันในเรื่องการยึดเกาะของเซลล์แบคทีเรียที่บริเวณเซลล์เยื่อของโฮสต์ โดย LPS จะจับกับบริเวณ asialo-GM1 receptor, CFTR และ Toll-like receptors ชนิด TLR4/CD14 หรือ TLR4/MD-2 ส่งผลให้มีการเพิ่มการสังเคราะห์และหลั่ง IL-8 ได้เช่นเดียวกัน โดยการอักเสบที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแฟลกเจลลาหรือ LPS ของเชื้อกับองค์ประกอบต่างๆ บนผิวเซลล์ของโฮสต์นั้นสามารถเกิดขึ้นโดยการกระตุ้นผ่านแนวทางที่เรียกว่า NF- κ B pathway โดยโครงสร้างต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะแบบไม่ผันกลับ (irreversible adhesion) นอกจากนี้เชื้อจะมีการสร้างโคโลนีที่เยื่อทางเดินหายใจในระยะเริ่มต้น (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91) จากนั้นเซลล์จะมีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไปโดยการใช้อาหารที่มีอยู่รอบๆ ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นกลุ่มของเซลล์ (colony) ที่มีขนาดใหญ่และเกาะรวมกันจนเกิดเป็นชั้นของเซลล์ (layer of cells) ปกคลุมบริเวณพื้นผิว ในระยะนี้เซลล์ที่เกาะติดอยู่จะมีการผลิตสารกลุ่มพอลิเมอร์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular polymeric substances) เช่น การสร้าง glycocalyx ชนิด alginate หรือ biofilm ออกมาคลุมอยู่ที่ผิวของกลุ่มเซลล์ ซึ่งสารที่สร้างขึ้นมานี้จะช่วยให้เซลล์ยึดเกาะพื้นผิวได้ดีและมีความเสถียรมากขึ้น ทำให้เชื้อมีความต้านทานหรือดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าเชื้อที่อยู่เดี่ยวๆ (planktonic) และเป็นเหตุให้กำจัดเชื้อได้ยากยิ่งขึ้น (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041) อีกทั้งยังมีบทบาทในการป้องกันหรือหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (host defenses) ได้แก่ ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ฟาโกไซต์ (phagocytes) แอนติบอดี และคอมพลีเมนต์ (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91)

1.5.2 การบุกรุกเฉพาะที่

มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกของเชื้อ *P. aeruginosa* เนื่องจากเชื้อมีความสามารถในการปรับตัวให้อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันได้ เช่น การสร้าง biofilm ขึ้นมาเพื่อหลีกเลี่ยงหรือป้องกันตัวเองจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ได้แก่ กระบวนการ phagocytosis การจับของแอนติบอดี และระบบคอมพลีเมนต์ อีกทั้งยังสามารถสร้างสารพิษ (toxins) หลายชนิดซึ่งเป็นปัจจัยก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค และเอนไซม์ (enzyme) ที่หลั่งออกนอกเซลล์ (secreted virulence factors) เพื่อบุกรุกและเข้าทำลายเซลล์โฮสต์ (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1035-1041) การยึดเกาะของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เซลล์เยื่อจะทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ type III secretion system โดยการฉีดสารพิษซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ ExoS, ExoY, ExoT, และ ExoU หรืออาจเป็นโปรตีนเอฟเฟคเตอร์ (effector proteins) อื่นๆ ที่มีบทบาทคล้ายกันผ่านโครงสร้างที่เรียกว่า syringe-like apparatus เข้าสู่ภายในไซโตพลาซึมของเซลล์โฮสต์โดยตรง (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91) สารพิษต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ หรือแม้แต่นำไปสู่กระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ของ neutrophil และ macrophage (Engel, J.; & Balachandran, P. 2009: 61-66) นอกจากนี้ยังมี alkaline protease ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีน fibrin ที่อยู่บนเซลล์เยื่อทางเดินหายใจของโฮสต์ผ่าน type I secretion system ส่วน type II secretion system ได้แก่ elastase, exotoxin A และ phospholipase C ซึ่งสารต่างๆ ที่หลั่งออกมานอกเซลล์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และการบุกรุกทำลาย glycoprotein ที่อยู่บนผิวเซลล์ทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีบทบาทคล้ายคลึงกันในการบุกรุกและเข้าทำลายเซลล์ของโฮสต์ ได้แก่ pyoverdine, pyocyanin, protease IV (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91) และ hemolysin (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1036) เป็นต้น ความสามารถในการก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์นี้เองที่นำไปสู่การบุกรุกและแพร่กระจายของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั่วร่างกาย (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91)

1.5.3 การแพร่กระจายของโรคไปทั่วร่างกาย

การแพร่กระจายของโรคไปทั่วร่างกายส่วนหนึ่งเกิดจากสารต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการบุกรุกเฉพาะที่ ซึ่งในกรณีของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infections) การบุกรุกทำให้เกิดการแพร่กระจายและเกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเป็นบริเวณกว้าง ขณะที่การติดเชื้อแบบเรื้อรังโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่เป็นโรค cystic fibrosis เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้โดยที่องค์ประกอบบนผิวเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อหลีกเลี่ยงการถูกตรวจพบโดยระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เช่น ขณะที่เชื้อมีการสร้างโคโลนีที่เยื่อในระบบทางเดินหายใจจะมีการสร้าง biofilm ขึ้นมาปกคลุมกลุ่มของโคโลนีทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ไม่สามารถตรวจพบได้ และแปลกเจลลาได้ ส่วนในการติดเชื้อเรื้อรังนั้นปัจจัยที่ก่อความรุนแรงของโรคที่หลั่งออกนอกเซลล์นี้เป็นปัจจัย

สำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบเป็นเวลานาน (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91) นอกจากนี้เชื่อว่า endotoxin ซึ่งเป็น lipopolysaccharide (LPS) ที่มีอยู่จำเพาะในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และ exotoxin A สามารถทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปทั่วร่างกายในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในกระแสโลหิต (*P. aeruginosa* sepsis) สำหรับ LPS ของเชื้อ *P. aeruginosa* มีฤทธิ์เช่นเดียวกับที่พบในแบคทีเรียแกรมลบทั่วไปคือ มีผลทำให้เกิดไข้ ความดันโลหิตต่ำลง ปัสสาวะออกน้อย เม็ดเลือดขาวต่ำลงหรือสูงขึ้น เกิดภาวะ disseminated intravascular coagulation (DIC) และภาวะ adult respiratory distress syndrome (ARDS) โดยผ่านการกระตุ้นระบบแข็งตัวของเลือด (clotting system), fibrinolytic, kinin และคอมพลีเมนต์ (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1036) อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นกระบวนการอักเสบได้อีกด้วย (Kipnis; Sawa; & Wiener-Kronish. 2006: 78-91) ในขณะที่ exotoxin A ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ phagocytes โดยยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ (สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. 2547: 1036) งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า exotoxin A เป็น virulent factor ที่สำคัญในการก่อให้เกิดความรุนแรงในการติดเชื้อ *P. aeruginosa* (Liu. 1974: S94-S99); (Iglewski; & Kabat. 1975: 2284-2288); (Iglewski; Liu; & Kabat. 1977: 138-144) ในปี 1998 เอลซาเอม และคนอื่นๆ (EL-zaim; et al. 1998: 5551-5554) พบว่า lethal dose (LD 50%) ของ exotoxin A ในปริมาณ 60-80 ng ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบ necrosis และยังพบมีการตกเลือดในปอดและไตในหนูทดลองที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยกลไกการทำงานของ exotoxin A จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ ADP ribosylation ซึ่งไปเร่งปฏิกิริยาทางเคมีที่จับกันระหว่าง NAD และ elongation factor 2 ส่งผลยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์สิ่งมีชีวิต (Armstrong; Yate; & Merrill. 2002: 227); (Mannafi; et al. 2009: 23)

6.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์

การจำแนกสปีชีส์ด้วยวิธีดั้งเดิมทำโดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น tryptic soy agar, blood agar หรือ Macconkey agar หรือเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เช่น cetrimide agar หรือ Muller-Hinton agar (นันทนา อรุณฤกษ์. 2537: 275-279) การจำแนกเชื้อสามารถพิจารณาจากลักษณะของโคโลนี เช่น ขนาด การสร้างรงควัตถุ กลิ่น และความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่า *P. aeruginosa* เจริญได้เร็วและให้โคโลนีมีลักษณะแบน มีขอบโคโลนีกระจายออกไป โคโลนีส่วนใหญ่สามารถสร้าง pigment ที่มีสีเขียวน้ำเงินซึมออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ และมีกลิ่นคล้ายอู่น (อรอนงค์ พริ้งสุลกษ. 2555: 226) ซึ่งการตรวจโดยใช้วิธีเหล่านี้ต้องใช้เวลา มีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลาและต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์ งานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้วิธีทางจุลชีววิทยาโดยการนำเสมหะจากผู้ป่วยโรคทางเดินหายใจเรื้อรังและผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่มีภูมิคุ้มกันต่ำมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่า

สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้นได้ แต่ไม่สามารถนำมาใช้แยก infection state ออกจาก colonization state ได้ (Noda; et al. 1992: 575-582); (Yamashita; et al. 2010: 198-204)

การจำแนกเชื้อที่เฉพาะเจาะจงอาศัยการทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ (Buchanan. 1974: 220-221); (Gilardi. 1984: 127); (Ghanei; Abeyrathne; & Lam. 2007: 26939-26947); (MacIntyre; McVeigh; & Owen. 1986: 675-686); (Palleroni. 2005: 323-379) เช่น การทดสอบการสร้างเม็ดสี (pigments) การสร้างเอนไซม์ hydrolase (hydrolase test), oxidase (oxidase test) เป็นต้น (ตาราง 2 และ 3) อย่างไรก็ตามการทดสอบทางชีวเคมีต้องใช้เวลานาน และมีวิธีการที่ยุ่งยากเนื่องจากต้องเสียเวลาเพิ่มในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารชนิดแข็งนานอีกหลายสัปดาห์ก่อนนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Ghanei; Abeyrathne; & Lam. 2007: 26939-26947); (MacIntyre; McVeigh; & Owen. 1986: 675-686); (Palleroni. 2005: 323-379) ทำให้การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเป็นไปได้ยากยิ่ง อีกทั้งยังมีความจำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะและต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ

ต่อมาได้มีผู้พัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อใช้พิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อ *P. aeruginosa* เช่น การใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (Hassan; et al. 2012: 90-98) การใช้เทคนิค restriction fragment-pattern analysis หรือ PCR-based generation of multiple differently sized DNA ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ *P. aeruginosa* ได้โดยใช้พื้นฐานของ genome fingerprinting techniques (Romling; et al. 1994: 1734-1738) และการทำ DNA hybridization (Palleroni; et al. 1972: 1-11) ในปัจจุบันมีการใช้การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (Anzai; et al. 2000: 1563-1589); (Palleroni. 2005: 323-379) และการใช้ Multilocus sequence analysis (MLSA) หรือ Multilocus sequence typing (MLST) (Curran; et al. 2004: 5644-5649); (Johnson; et al. 2007: 3707-3712); (Khan; et al. 2008: 6194-6205) วิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงโดยใช้ระยะเวลาในการตรวจไม่นาน แต่พบว่ามีค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะและยังคงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ

ตาราง 2 การทดสอบทางชีวเคมีแสดงคุณสมบัติบางประการของเชื้อ *P. aeruginosa* เปรียบเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ
ภายในจีนัส *Pseudomonas* (ปรับปรุงจาก Buchanan, R. E. 1974: 220-221)

Species of <i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>p. fluorescens</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aureofaciens</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. alcaligenes</i>
Fluorescent pigments	d*	+	+	+	+	+	+	-*	-	-
Pyocyanine	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carotenoids	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth at 41 °C	+	-	-	-	-	-	-	d	+	+
Levan formation from sucrose	-	-	d	d	d	d	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Oxidase reaction	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Denitification	+	-	d	d	d	-	-	+	+	-
Hydrolysis of:										
Gelatin	+	-	+	+	+	d	-	-	-	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
poly- β -hydroxybutyrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbon sources for growth:										
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2-Ketogluconate	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Meso-Inositol	-	-	+	+	+	d	d	-	-	-
Geraniol	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Valine	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
β -Alanine	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
DL-Arginine	+	+	+	+	+	d	+	-	+	+

* = ให้ผลเป็นบวกหรือลบ $\geq 90\%$ ของสายพันธุ์ทั้งหมด

+ = ให้ผลบวก

- = ให้ผลลบ

d = ให้ผลบวกตั้งแต่ 10% ถึง 90% ของสายพันธุ์ทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ

ตาราง 3 การทดสอบทางชีวเคมีแสดงตัวอย่างลักษณะต่างๆ ของสปีชีส์ต่างๆ ภายในจีนัส *Pseudomonas*
(ปรับปรุงจาก Gilardi, G. L. 1984: 127)

Species (number of strains)	<i>P. aeruginosa</i> * (84)	<i>P. maltophilia</i> (527)	<i>P. cepacia</i> (201)	<i>P. fluorescens</i> (194)	<i>P. putida</i> (273)	<i>P. stutzeri</i> (168)	<i>P. putrefaciens</i> (72)	<i>P. paucimobili</i> (110)	<i>P. acidovorans</i> (95)	<i>P. alcaligenes</i> (51)
Oxidase	100	2	92	100	100	100	100	90	100	100
Growth at 42 °C	100	48	58	0	0	89	65	0	10	59
Gas from nitrate	61	0	0	5	0	100	0	0	0	16
Acid in O-F glucose	98	100	100	100	100	100	100	100	0	0
Acid in O-F lactose	0	88	98	12	14	0	3	100	0	0
Acid in O-F fructose	89	99	100	99	99	94	53	100	100	0
Lysine decarboxylase	0	99	90	0	0	0	0	0	0	0
Arginine dihydrolase	100	0	0	99	99	5	0	0	0	10
Ornithine decarboxylase	0	0	65	0	0	0	99	0	0	0
Gelatin Hydrolysis	50	100	74	100	0	1	97	0	2	2

ตัวเลขแสดงหน่วยเป็นอัตราส่วนร้อยละ

* = Apyocyanogenic strains

O-F = Oxidative-fermentative

2. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่สร้างมาจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากบี-เซลล์เพียงเซลล์เดียวจึงทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจน และในด้านชนิดของสายสั้น (light chain) และสายยาว (heavy chain) ของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น เนื่องจากแอนติเจนแต่ละชนิดมีอีพิโทปจำนวนมาก จึงสามารถชักนำการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละอีพิโทปเป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งสามารถทำหน้าที่ต่างๆ กันเช่น จับกับแอนติเจนหรือกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ในการสลายแอนติเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อตัวของสิ่งมีชีวิตเองที่สามารถชักนำการตอบสนองในรูปแบบต่างๆ เพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ แต่ความหลากหลายของแอนติบอดีในซีรัม ทำให้แอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่ำและอาจไปทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับแอนติเจนอื่นซึ่งส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากแอนติบอดีนั้นมีไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้นการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจาก 1 โคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-232)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีหลอมรวมเซลล์ (somatic hybridization) ได้ถูกคิดค้นเป็นผลสำเร็จโดย Köhler และ Milstein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการนำบี-เซลล์จากม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมาเซลล์ (myeloma cell) จากสมบัติของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด คือ บี-เซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีได้แต่ไม่สามารถมีชีวิตยาวนานจึงมีอายุจำกัด ในขณะที่ไมอีโลมาเซลล์ไม่สามารถผลิตแอนติบอดีแต่สามารถแบ่งตัวเติบโตได้ไม่จำกัดให้สมบัติความเป็นอมตะ ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาหลอมรวมกัน ทำให้ได้เป็นเซลล์ลูกผสมหรือไฮบริโดมา (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนเพียงชนิดเดียวซึ่งเรียกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมากและแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ไม่มีที่สิ้นสุด

หลังจากที่มีการหลอมรวมไมอีโลมาเซลล์กับบี-เซลล์จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีโดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) ในทางปฏิบัตินั้นไม่สามารถหลอมรวมทุกเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไป ได้แก่ การใช้ไมอีโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในขบวนการ salvage pathway คือมีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์

ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ ไมโอโลมาเซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่จะมีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างไมโอโลมาเซลล์กับบี-เซลล์เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เนื่องจากได้เอนไซม์ที่ใช้ใน salvage pathway จากบี-เซลล์ และในขณะเดียวกันบี-เซลล์ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และจะตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-232)

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium มีพื้นฐานมาจากเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ได้ 2 วิธี คือ *de novo* pathway และ salvage pathway ในการนี้ของ *de novo* pathway จะมีขั้นตอนการย้ายหมู่ methyl หรือ 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 นั้นได้แก่ เอนไซม์ 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 HGPRT หรือ TK จะไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium เพราะไม่สามารถใช้ salvage pathway ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-232)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักใช้ไมโอโลมาเซลล์ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ (1) มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT (HGPRT⁻) และ (2) ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้าม ส่วนไมโอโลมาเซลล์เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และการทดสอบทางวิทยภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่างๆ เช่น วิธี dot-blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่นๆ ตามแต่ความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริงๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-232)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านได้แก่ (1) ด้านการวิจัย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียง 1

ตำแหน่งบนแอนติเจน จึงสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ หรือตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์หรือจุลินทรีย์ต่างๆ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (2) ในด้านการแพทย์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ในแง่การวินิจฉัย การตรวจ และการใช้รักษาโรค ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่างๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้มข้นได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548: 90-232)

เนื่องจากเชื้อ *P. aeruginosa* มีโครงสร้างที่ผิวเซลล์เป็น LPS ซึ่งมีลักษณะเป็น multivalent epitope ประกอบด้วย lipid A, core oligosaccharide และ O-antigen (Chester; et al. 1973: 305-318); (Ghanei; Abeyrathne; & Lam. 2007: 26939-26947) และ H-antigen ที่ส่วนของ flagellum (Allison; et al. 1985: 770-774) สามารถชักนำการกระตุ้นการตอบสนองโดยโคลนต่างๆ ของบี-เซลล์จำนวนมากที่ตรวจจับแต่ละ epitope ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากบนแอนติเจน เป็นผลให้มีการสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในซีรัม ซึ่งเรียกแอนติบอดีแต่ละชนิดจำเพาะต่อแต่ละอีพิโทปรวมอยู่ด้วยกันในซีรัมว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 90-232) รายงานการใช้ rabbit polyclonal antiserum ในการจำแนกเชื้อ *P. aeruginosa* (Allison; et al. 1985: 770-774); (Pitt; et al. 1986: 179-186) พบว่าการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ การศึกษาต่อมาพบว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากหนึ่งโคลนของบี-เซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยมีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. aeruginosa* จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* ที่อยู่ในรูปแบบ formalin-fixed เป็นแอนติเจน (Jamasbi; 1999: 10-15); (Lam; et al. 1987a: 2854-2856; 1987b: 1051-1057; 1992: 2178-2184) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในแบคทีเรียชนิดอื่น แต่พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางคลินิกเท่านั้นไม่สามารถแยกสายพันธุ์ที่พบในสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. aeruginosa* โดยปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรียทั้งเซลล์ แล้วคัดเลือกเฉพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* spp. หรือแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวกชนิดอื่นๆ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและคัดกรองเชื้อที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และตรวจสอบสินค้าส่งออกที่สำคัญ อีกทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ในการที่จะการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. aeruginosa* ซึ่งจะนำไปสู่การดูแลรักษาด้วยยารักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่ถูกต้อง รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรีย

สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้มีดังนี้

1. หนูขาว (Swiss mice) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 25 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง (ตาราง 4)

ตาราง 4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	ชื่อย่อ	รหัส	เลขที่	แหล่งที่มา
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA1	24988	DMST	sputum
	PA2	25000	DMST	sputum
	PA3	25617	DMST	sputum
	PA4	25965	DMST	urine
	PA5	26217	DMST	sputum
	PA6	26225	DMST	compost
	PA7	9027	ATCC	outer-ear infection
		(781)	(TISTR)	-
	PA8	15442	ATCC	animal room water bottle
	PA9	27853	ATCC	blood culture
	PA10	10145	ATCC	bacterial resistance testing of latex paint
		(1101)	(TISTR)	-
	PA11	12610	DMST	sputum
	PA12	15007	DMST	blood culture
	PA13	15718	DMST	blood
	PA14	1287	DMST	pus
	PA15	16947	DMST	fluid
	PA16	17941	DMST	Intercostal Drainage

ตาราง 4 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ชื่อย่อ	รหัส	เลขที่	แหล่งที่มา
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA17	20045	DMST	cerebrospinal fluid
	PA18	25552	DMST	urine
	PA19	26782	DMST	heart blood
	PA20	27116	DMST	endotracheal
	PA21	357	TISTR	used in training course
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	PC	9446	ATCC	plate contaminant
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PF1	26030	DMST	Tuberous Sclerosis Complex
	PF2	13525	ATCC	pre-filter tank, England
<i>Pseudomonas japonica</i>	PJ	1526	TISTR	flower of <i>Heliconia</i> sp. (paksasawan), Thailand
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	PO	1097	TISTR	epoxidizes terminal olefins
<i>Pseudomonas putida</i>	PP1	23201	DMST	cerebrospinal fluid
	PP2	27522	ATCC	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PSt	22487	DMST	blood culture
<i>Pseudomonas syringae</i>	PSy	19310	ATCC	syringe vulgaris, Great Britain
<i>Aeromonas caviae</i>	AC	22106	DMST	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AH	22097	DMST	-
<i>Aeromonas jandii</i>	AJ	22100	DMST	-
<i>Aeromonas sobria</i>	AS	22100	DMST	-
<i>Aeromonas veronii</i>	AV	-	DMST	-
<i>Escherichia coli</i>	EC	25922	CPF	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	E. clo	-	DMSM	-
<i>Enterococcus</i> sp.	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	DMSM	-
<i>Photobacterium damsela</i> <i>sub damsela</i>	PDD	-	-	-
<i>Photobacterium damsela</i> <i>sub piscicida</i>	PDP	-	UK	Sea bream
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	PS1	22107	DMST	rectal swab
<i>Proteus vulgaris</i>	PV	-	DMSM	-

ตาราง 4 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ชื่อย่อ	รหัส	เลขที่	แหล่งที่มา
<i>Shigella flexneri</i>	SF	-	DMSM	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	Vang	AVL01	GB	-
<i>Vibrio cholerae</i> O139	VC	22135	DMST	stool
<i>Vibrio fluvialis</i>	VF	22085	DMST	rectal swab
<i>Vibrio haeveyi</i>	VH	22889	LMG	unknown
<i>Vibrio mimicus</i>	VM	22088	DMST	food
<i>Vibrio ordalii</i>	Vord	VIB02	DABU	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP	22093	DMST	food
<i>V. penaeicida</i>	Vpen	-	DMSC	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	VV	27427	DMST	blood
<i>Yersinia ruckeri</i>	-	-	-	-

หมายเหตุ ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd

DABU = Department of Aquatic Science, Burapa University

DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health. Thailand

GB = Ghent University, Belgium

LMG = Laboratory of Microbiology, Ghent University, Belgium

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

UK = United Kingdom

- = unknown

อุปกรณ์

1. Microcentrifuge tube ยี่ห้อ eppendorf
2. หม้อหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
3. ตู้อบ (Hot air oven) ของบริษัท Sanyo, Thailand
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany
5. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., Switzerland
6. เครื่องชั่ง รุ่น A200S ของบริษัท Sartorius, Germany
7. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO₂ Incubator) รุ่น NU-2500V ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.
8. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) รุ่น NU-201-330E ของบริษัท NUAIRE, U.S.A.
9. กล้อง Inverted microscope รุ่น IX 70 ของบริษัท Olympus,
10. เครื่อง Electrophoresis apparatus และอุปกรณ์ ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
11. ชุด Transblot apparatus ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
12. ตู้แช่แข็ง -20°C ของบริษัท Sanyo, Thailand
13. ตู้แช่แข็ง -70°C ของบริษัท Sanyo, Thailand

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
(ภาคผนวก ก)
2. Ether ของบริษัท Merck, Germany
3. Agar ของบริษัท Gibco, U.S.A.
4. Acrylamide ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
5. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
6. Tris (hydroxymethyl) aminomethane ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
7. Sodium dodecyl sulfate (SDS) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
8. Ammonium persulfate ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
9. Dimethylsulfoxide (DMSO) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
10. SDS molecular weight markers ของบริษัท Sigma, U.S.A.

11. ชุดตรวจสอบ Hybridoma sub-isotyping, mouse ของบริษัท Zymed, U.S.A.
12. Ethyl alcohol ของบริษัท BDH,
13. Formaldehyde ของบริษัท Carlo Erba, Germany
14. Xylene ของบริษัท Carlo Erba, Germany
15. Hydrogenperoxide (H_2O_2) 30% ของบริษัท Sigma, U.S.A.
16. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ของบริษัท Sigma, U.S.A.
17. GAM-HRP (goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate) ของบริษัท BIO-RAD, U.S.A.
18. Hydrochloric acid (HCl) ของบริษัท Merck, Germany
19. Sodium hydroxide (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
20. Sodium chloride (NaCl) ของบริษัท Merck, Germany
21. Potassium chloride (KCl) ของบริษัท Merck, Germany
22. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ของบริษัท Merck, Germany
23. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) ของบริษัท Merck, Germany
24. Methiolate ของบริษัท Sigma, U.S.A.
25. Triton X-100 ของบริษัท Sigma, U.S.A.
26. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ของบริษัท Gibco, U.S.A. (ภาคผนวก ค)
27. Fetal bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia
28. Calf bovine serum ของบริษัท Starrate, Australia
29. D-glucose ของบริษัท Gibco, U.S.A.
30. L-glutamine ของบริษัท Gibco, U.S.A.
31. Sodium pyruvate ของบริษัท Sigma, U.S.A.
32. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ของบริษัท Amresco, U.S.A.
33. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffered saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (ภาคผนวก ช)
34. HT supplements ของบริษัท Gibco, U.S.A.
35. Aminopterin ของบริษัท Sigma, U.S.A.
36. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) ของบริษัท Amresco

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ดังที่แสดงไว้ในตาราง 4 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) ส่วนแบคทีเรียสกุล *Vibrio* นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยง TSA ที่เติม NaCl เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลี้ยงและคัดเลือกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทำการเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และเก็บเซลล์แบคทีเรียในรูปของสารแขวนลอยโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) ที่เติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียที่ได้ส่วนหนึ่งจะถูกเก็บโดยเติมบัฟเฟอร์ 0.15 M phosphate buffered saline (PBS) และดูดเซลล์แบคทีเรียเก็บในรูปสารแขวนลอย จากนั้นล้างเซลล์แขวนลอยเพื่อกำจัด exotoxin และนำไปฆ่าด้วยความร้อน (heat killed) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วเจือจางสารแขวนลอยเซลล์ด้วย PBS ให้มีค่า OD เท่ากับ 1.0 (เทียบเท่ากับปริมาณ 1×10^9 CFU/ml) (ภาพประกอบ 1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดสอบและปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวต่อไป

1.2 การเตรียมแอนติเจน

ทำการเตรียมแบคทีเรีย โดยแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ รูปแบบ heat-killed โดยการฆ่าด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และรูปแบบ formalin-fixed (ภาพประกอบ 1) โดยนำแบคทีเรียในรูปแบบ heat-killed มาผสมกับ 40% formaldehyde ในอัตราส่วน 1: 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง 5 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำ dialyse ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะหมดกลิ่นของ formaldehyde จากนั้นแบ่งแอนติเจนที่ได้ใส่หลอด microcentrifuge และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูต่อไป

1.3 การปลูกภูมิคุ้มกัน

การปลูกภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาวแบ่งออกเป็น 2 ชุดตามรูปแบบของแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้น คือ 1) ชุดที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 21 ไอโซเลตเป็นแอนติเจน และ 2) ชุดที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ PA1, PA4, PA5, PA13, PA14, PA16, PA17 และ PA21 เป็นแอนติเจน ซึ่งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ใช้สำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวชุดที่ 2 นี้คัดเลือกจากผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มที่ได้จากหนูขาวชุดที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting

การปลูกหมักร่วมกันหนูล้างครั้งแรกทำโดยนำแอนติเจนที่เตรียมได้จากวิธีการในข้อ 1.2 ทั้ง 2 รูปแบบ ผสมในอัตราส่วนเท่ากัน แล้วนำมาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ก่อนนำไปฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูขาว จำนวน 4 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร (ภาพประกอบ 1) จากนั้นทุก 2 สัปดาห์ฉีดกระตุ้นอีก 3 ครั้ง โดยใช้แอนติเจนผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) หลังจากทำการฉีดครั้งที่ 4 ประมาณ 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดหนูแต่ละตัวเพื่อใช้ในการตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ โดยวิธี Western blotting แล้วเลือกหนูตัวที่มีการตอบสนองดีที่สุดมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

1.4 การเก็บเลือดหนู

หลังจากการปลูกหมักร่วมกันครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดหนู โดยการสลบหนูด้วย ether จากนั้นนำหนูออกมาวางบนพื้นสะอาดที่เช็ดด้วย 70% ethyl alcohol จับหนังบริเวณหลังของหนู ตั้งขึ้นให้ตั้งจนตาลนออกเล็กน้อย นำ sterile pasture pipett (เคลือบด้วย silicone เพื่อชะลออัตราการแข็งตัวของเลือด) ที่สวมเข้ากับหลอดยาง สอดปลายปิเปตตรงกลางเข้าตาด้านล่างเฉียงไปทางด้านหลังเล็กน้อย เพื่อดันกลุ่มเส้นเลือดบริเวณแอ่งเลือดบริเวณตา (orbital sinus) ให้แตก ดูดเบาๆ จนเลือดไหลเข้าสู่ปิเปตในปริมาตรที่ต้องการประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ระมัดระวังให้เกิดฟองอากาศเนื่องจากจะเร่งให้เลือดแข็งตัว ดูดเลือดใส่ใน sterile microcentrifuge tube ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกซีรั่มด้วยความเร็ว $3,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูดซีรั่ม (ส่วนใสด้านบน) แต่ละหลอดของหนูแต่ละตัวแยกเก็บไว้ โดยเติม 1% methiorate ในอัตราส่วน 1: 100 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นทำการดูดซับแอนติซีรั่มที่ได้ด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำแอนติซีรั่มที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บเลือดหนูสามารถเก็บซ้ำได้โดยทั้งช่วงการเก็บเลือดแต่ละครั้งเป็นเวลอย่างน้อย 1 เดือน จากนั้นนำแอนติซีรั่มที่ได้ไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติซีรั่มต่อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ โดยวิธี dot blotting และ Western blotting (ภาพประกอบ 1) แล้วเลือกหนูขาวตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป

2 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาดัดแปลงจากวิธีการที่พัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein (1975) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ตอบสนองดีที่สุดมาทำการฉีดด้วยแบคทีเรียทั้ง 2 รูปแบบที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1: 1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ลูกผสม 3 วัน จากนั้นแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell (เซลล์มะเร็งของหนู) โดยใช้ 50% polyethylene glycol (PEG) ผสมเซลล์ให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ที่มีส่วนผสมของ hypoxanthine (H) และ thymidine (T) แล้วทำการบ่มเซลล์ไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกระจายเซลล์ลงเลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 wells microculture plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI กับ 20% Fetal calf bovine serum (FBS) และ aminopterin (A) จำนวน 20 plate เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นระยะเวลาประมาณ 7-10 วัน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ แล้วทำการทดสอบเพื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเพียงเซลล์เดียว ด้วยวิธี limited dilution และขยายเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการ จากนั้นเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid N₂) ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะเก็บไว้ใช้ทดสอบต่อไป (ภาพประกอบ 2)

3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

ขั้นตอนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 plate ทำให้ได้ไฮบริโดมาจำนวนมากจึงจำเป็นต้องคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* โดยทำการคัดเลือก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 คัดเลือกด้วยวิธี dot blotting และคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting ต่อไป

3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

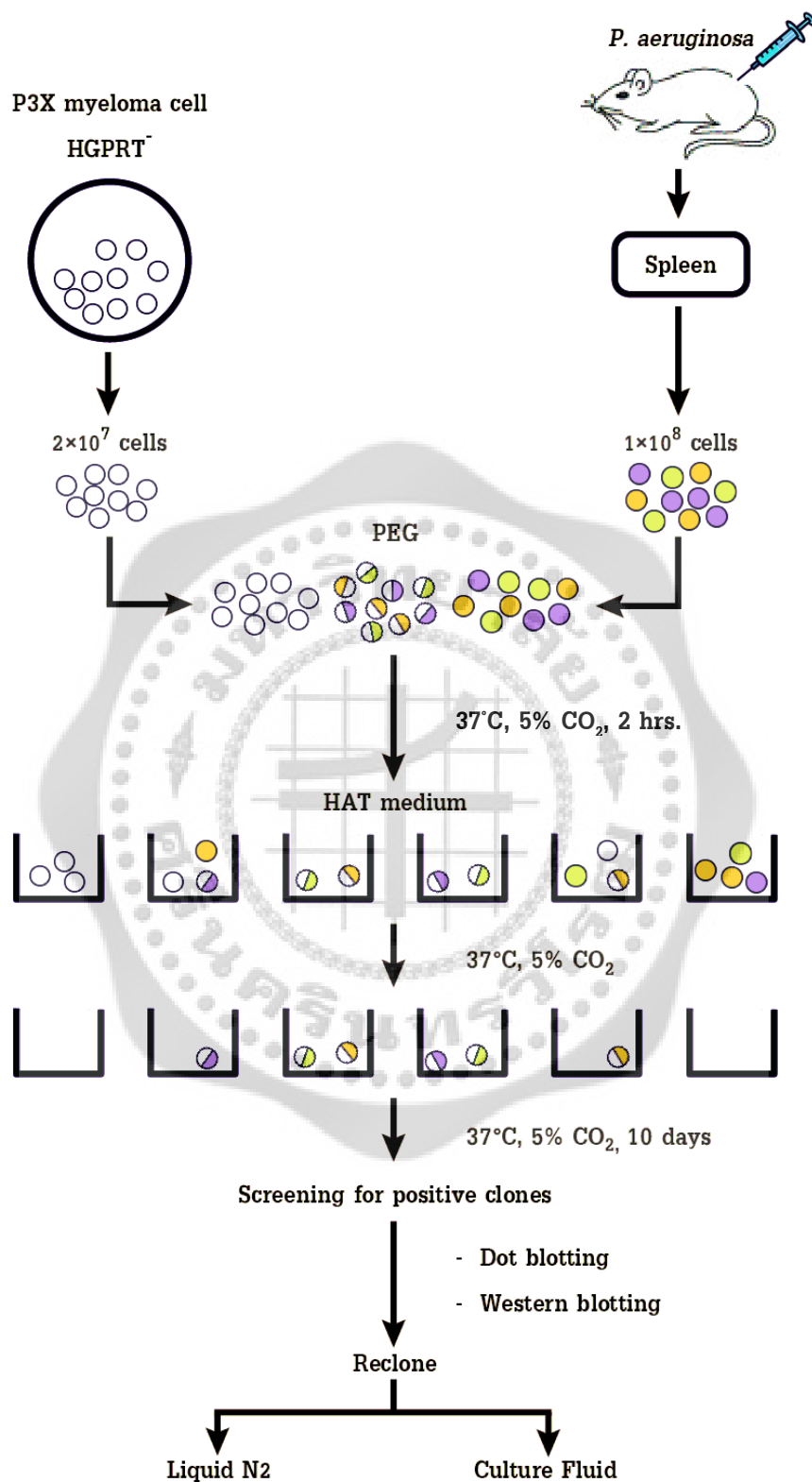
นำเชื้อ *P. aeruginosa* และเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่อยู่ในรูป heat-killed มาหยดลงบนกระดาษ nitrocellulose membrane (ความเข้มข้น 10⁸ CFU/ml) อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 1% blotto (นมพว่องมันเนย 1% ที่ละลายใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุม (น้ำยาเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1: 8 ใน 1% blotto) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำไปบ่มต่อใน goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish

peroxidase conjugate (GAM-HRP) เจือจาง 1: 1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 4 ครั้ง จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย substrate ที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ละลายใน PBS (Sithigorngul; et al, 2000) (ภาพประกอบ 3) เลือกไฮบริโดมาโคลนหลุมที่ให้สีเกิดขึ้นบน nitrocellulose membrane ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* แต่ไม่จำเพาะต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไปคัดเลือกต่อโดยการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity test) โดยวิธี dot blotting และ Western blotting ก่อนนำไป reclone และ cryopreservation สำหรับการศึกษาต่อไป

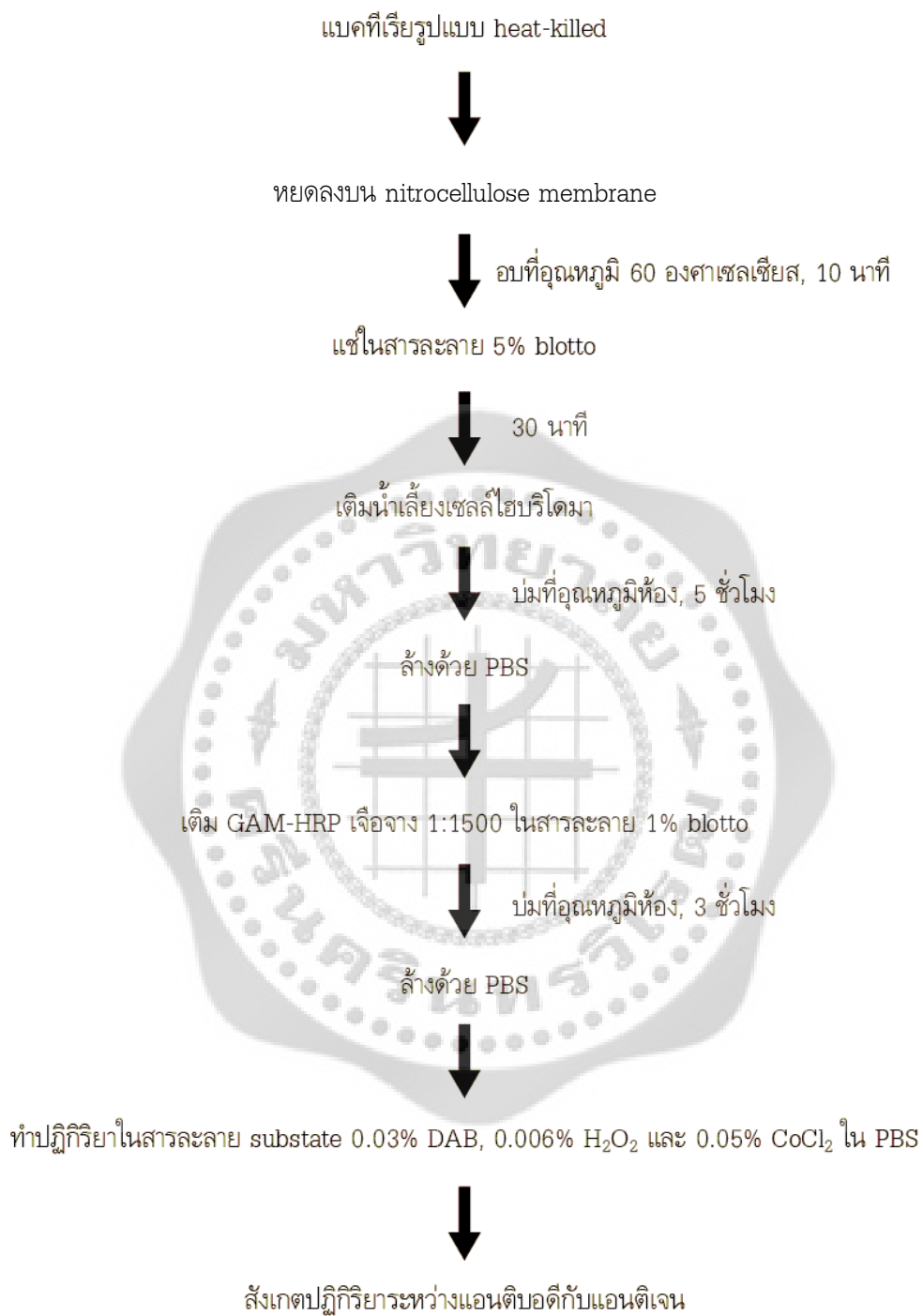




ภาพประกอบ 1 แผนผังการเตรียมแอนติเจนและการปลูกรวมกันในหนูขาว



ภาพประกอบ 2 แผนผังการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา (ดัดแปลงจากไพศาล สิทธิกรกุล. 2548: 94)



ภาพประกอบ 3 แผนผังการคัดเลือกขั้นที่ 1 (ข้อ 3.1) ด้วยวิธี dot blotting (ดัดแปลงจาก Sithigorngul; et al. 2000)

3.2 การคัดเลือกชั้นที่ 2

3.2.1 การคัดเลือกจากปฏิกิริยาข้ามโดยวิธี Dot blotting

นำเชื้อ *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. และแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ ที่อยู่รูป heat-killed form ที่ได้แสดงไว้ในตาราง 4 มาหยดบน nitrocellulose membrane (ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร/หยด) อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แหในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting ในขั้นตอนที่ 1 (เจือจาง 1: 40 ในสารละลาย 1% blotto) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนต่างๆ เหมือนกับในข้อ 3.1 ตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จากจุดสีดำนที่เกิดขึ้นบน nitrocellulose membrane

3.2.2 การคัดเลือกโดยวิธี Western blotting

นำเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 12 ไอโซเลต (PA1, PA4, PA5, PA8, PA11, PA13, PA15, PA18, PA21 และ PA22) ในรูปแบบ heat-killed มาผสมกับ 2X treatment buffer อัตราส่วน 1: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที ทำการแยกแอมโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยเตรียม 15% separating gel (ตาราง 5) ผ่านกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ จากนั้นนำเจลไปทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ transblot apparatus ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำ nitrocellulose membrane แหในสารละลาย 1% blotto เป็นเวลา 10 นาที ตัดแบ่งให้เป็นเส้นที่มีขนาดประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร แล้วนำมาบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting ในขั้นตอนแรกแล้ว ที่เจือจาง 1:40 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS นำไปบ่มใน GAM-HRP เจือจางในอัตราส่วน 1: 1,500 ในสารละลาย 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และนำไปบ่มในสารละลาย substrate (0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 , 0.05% $CoCl_2$ ละลายใน PBS) (ภาพประกอบ 4) ตรวจสอบแถบของโปรตีนสีดำนที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีจับกับแอนติเจนเพื่อยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *P. aeruginosa*

ตาราง 5 ส่วนผสมของ SDS-PAGE (ดัดแปลงมาจาก Hoefer. 1986)

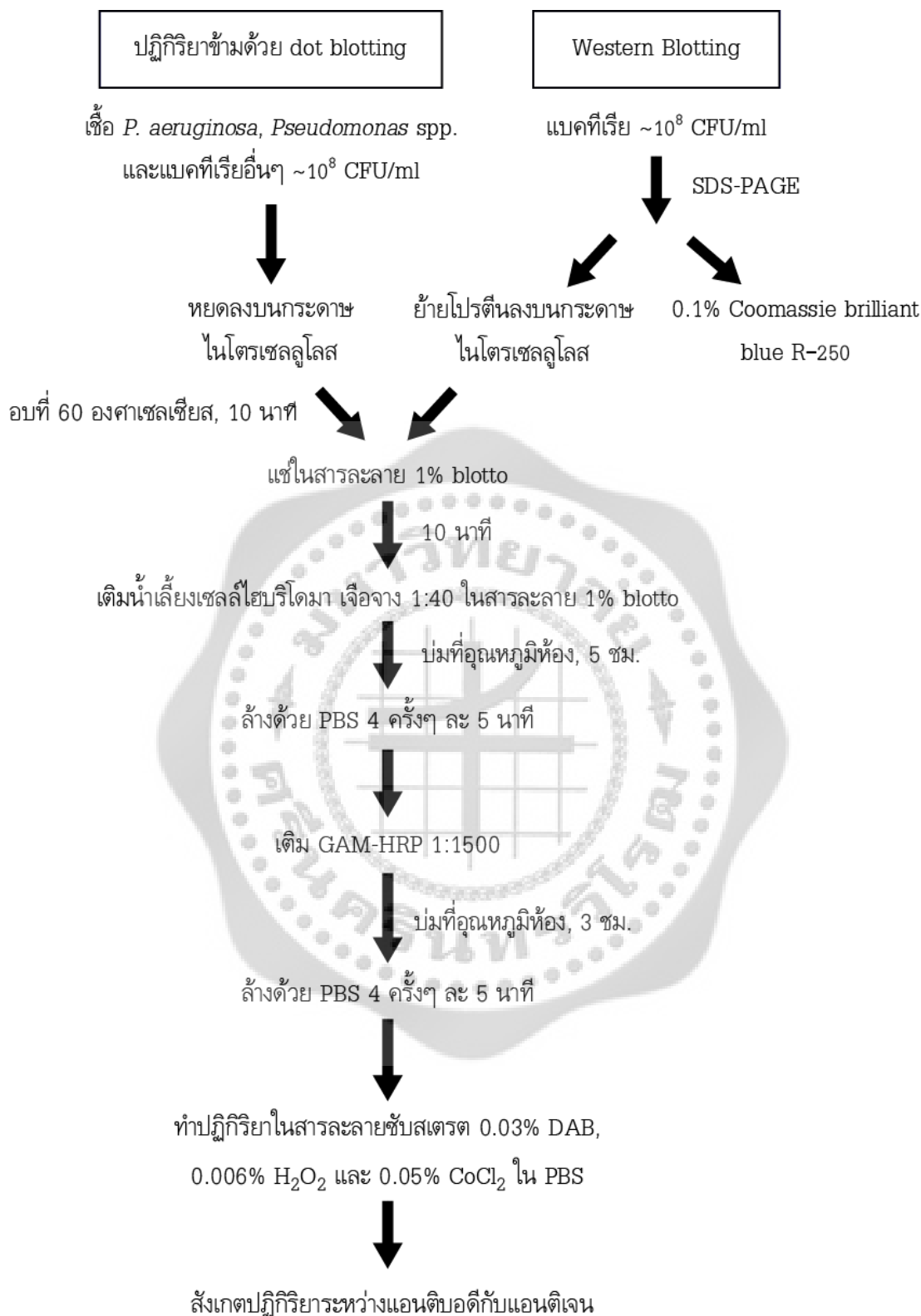
สาร	15% separating gel (30 มิลลิลิตร)	4% stacking gel (5 มิลลิลิตร)
30%T 2.7% C _{Bis} (Monomer)	15 มิลลิลิตร	0.67 มิลลิลิตร
1.5 M Tris-Cl pH 8.8 (Buffer2)	7.5 มิลลิลิตร	-
0.5 M Tris-Cl pH 6.8 (Buffer2)	-	1.25 มิลลิลิตร
10% SDS	300 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	6.75 มิลลิลิตร	3.05 มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate (Amp)	150 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
TEMED	20 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร

3.3 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

กระจายเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกแล้วโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง หยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ โดยนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นเติม HT medium (อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, เม็ดเลือดแดง 0.5%, hypoxanthine และ thymidine) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน 96 well microculture plate จำนวน 32 หลุมแรก (คอลัมน์ 1-4, แถว A-H) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม HT medium เพิ่มในจานเลี้ยงเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ลงใน 32 หลุมหลัง (คอลัมน์ 5-12, แถว A-D) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติม HT medium เพิ่มในจานเลี้ยงเชื้ออีก 2 มิลลิลิตร แล้วดูดใส่ลงใน 32 หลุมที่เหลือ (คอลัมน์ 5-12, แถว E-H) ป้อนใน CO₂ incubator (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-12 วัน ตรวจสอบหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายใต้กล้อง inverted microscope จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี dot blotting และขยายเพิ่มจำนวนเซลล์

3.4 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ในระยะ log phase ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000 ×g เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาที่ตกตะกอนอยู่ก้นหลอดนำมาเติมสารละลาย 12% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน cryopreservation tube แล้วเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส)



ภาพประกอบ 4 แผนผังการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ใน
การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting

4. การศึกษาสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากการโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution ทำการทดสอบยืนยันน้ำเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกแต่ละโคลนที่ได้โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 และตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาจำแนก class และ subclass ด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี dot blotting

4.1 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

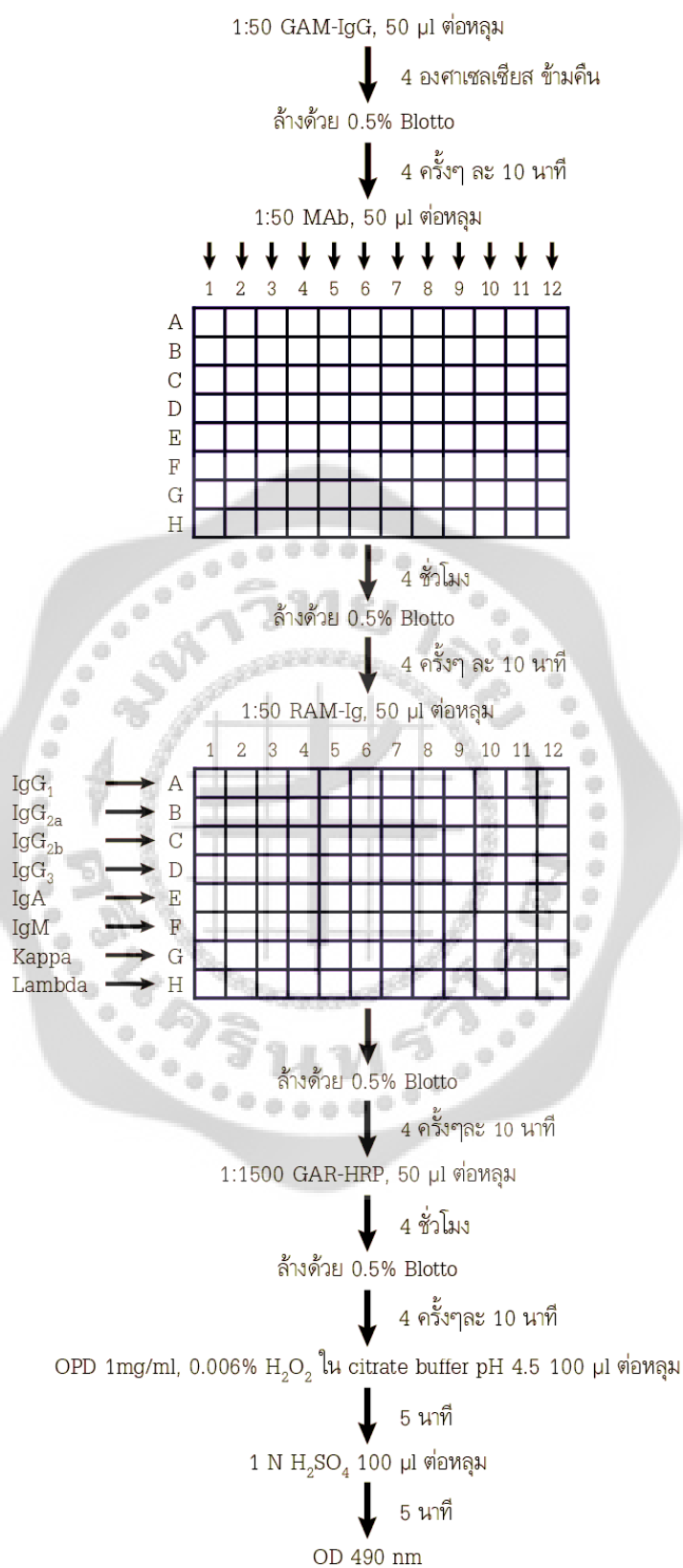
การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ sub-isotyping kit จาก Zymed Laboratories โดยทำการเคลือบ 96 well microculture plate ด้วย goat anti-mouse IgG (GAM-IgG) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติมสารละลาย 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1: 50 ในสารละลาย 5% blotto แถวละ 1 ชนิด (1-12) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม rabbit anti-isotype antibodies (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, λ และ κ) เจือจาง 1: 20 ในสารละลาย 0.5% blotto แถวละ 1 ชนิด (A-H) หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย 5% blotto หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1: 1,000 ในสารละลาย 5% blotto หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS หลุมละ 150 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายซับสเตรต O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.006% H_2O_2 ใน 0.1 โมลาร์ ซิตเรตบัฟเฟอร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 นอร์มอล กรดซัลฟูริก หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลโดยสังเกตสีที่เกิดขึ้นในแต่ละหลุม หรืออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจะให้สีเข้ม 1 หลุมตาม isotype และอีก 1 หลุมตามชนิดของโปรตีนสายสั้น (light chain) (ภาพประกอบ 5)

4.2 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อ *P. aeruginosa* โดย

วิธี dot blotting

นำเชื้อ *P. aeruginosa* ที่อยู่สภาพ heat-killed ซึ่งมีความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 10^8 CFU/ml จนถึง 10^3 CFU/ml ไปหยดลงบน nitrocellulose membrane ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในสารละลาย 1% blotto บ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ แล้วนำมาผ่านขั้นตอนเหมือนกับในข้อ 3.1 จากนั้นตรวจดูระดับความเข้มข้นของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ต่ำสุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า





ภาพประกอบ 5 วิธีการทดลองการจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ดัดแปลงจาก

Winotaphan et al. 2005: 189-198)

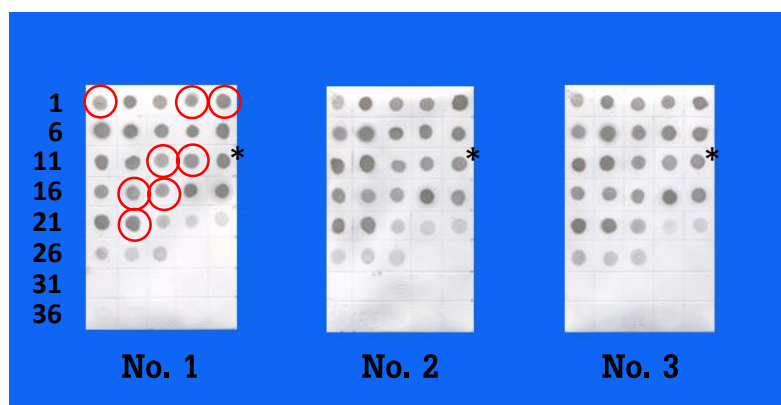
บทที่ 4

ผลการทดลอง

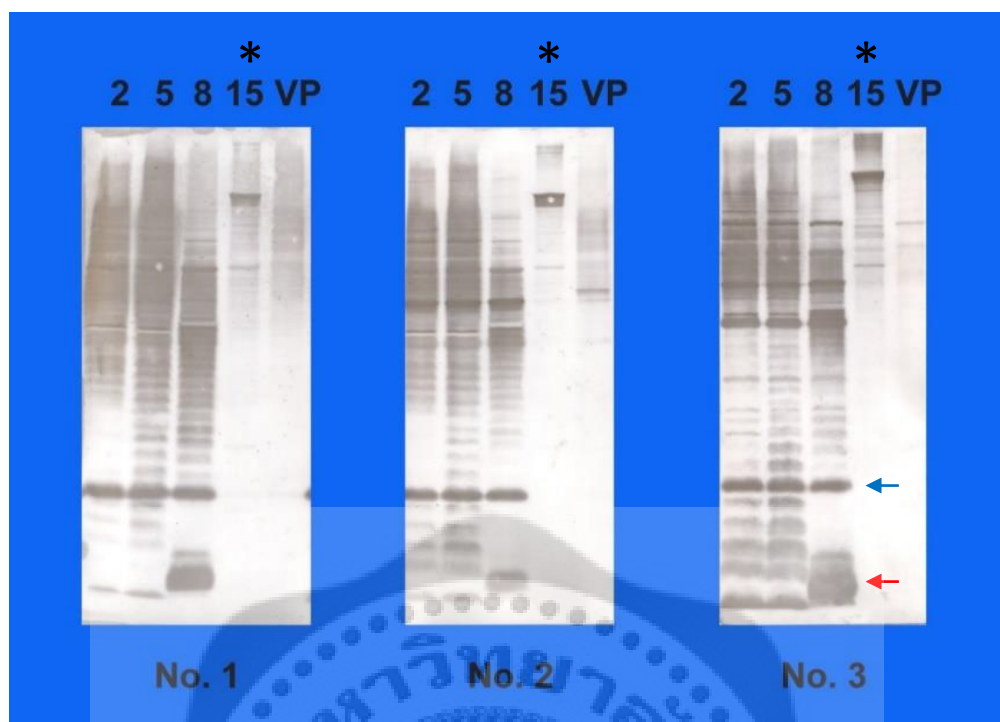
1. การปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวครั้งที่ 4 แล้ว ทำการเก็บแอนติซีรัม (mouse-anti *P. aeruginosa* antiserum) และนำมาดูดซับด้วย *V. parahaemolyticus* แล้วนำไปทดสอบความจำเพาะต่อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ โดยวิธี dot blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูขาวชุดที่ 1 ทั้ง 3 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 21 ไอโซเลต สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 21 ไอโซเลตและสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ ที่ใช้ทดสอบ (ภาพประกอบ 6) และเมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของหนูแต่ละตัวด้วยวิธี Western blotting เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ขนาดต่างๆ พบว่าแอนติซีรัมที่ได้จากหนูทั้ง 3 ตัวสามารถจับกับแถบแอนติเจนของ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ ได้เป็นจำนวนมาก (ภาพประกอบ 7) โดยหนูขาวทั้ง 3 ตัวให้ผลการตอบสนองที่คล้ายกันจึงเลือกหนูทั้ง 3 ตัวมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา ทั้งนี้หลังจากการตรวจสอบเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ ด้วยวิธี PCR แล้วพบว่า PA15 ไม่ใช่เชื้อ *P. aeruginosa* จึงไม่ได้นำมาใช้ในการทดสอบต่อไป

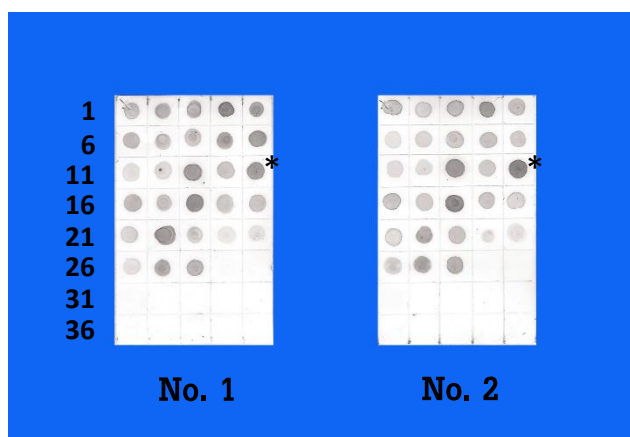
สำหรับการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวชุดที่ 2 นั้นได้คัดเลือกเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ PA1, PA4, PA5, PA13, PA14, PA16, PA17 และ PA21 โดยคัดเลือกจากการทดสอบแอนติซีรัมของหนูขาวชุดที่ 1 ในการจับเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting โดยพิจารณาจากผลการติดสีเข้มและจางของเชื้อ *P. aeruginosa* (ภาพประกอบ 7) ซึ่งหลังจากปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 แล้วนำแอนติซีรัมที่ได้จากหนูขาว 2 ตัวมาทดสอบพบว่าสามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ทั้ง 21 ไอโซเลตและสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 8) และเมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าสามารถจับแถบแอนติเจนของ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ ได้เป็นจำนวนมาก โดยหนูขาวตัวที่ 1 ให้ผลการตอบสนองดีที่สุดและพบแถบโปรตีนเป็นจำนวนมากและชัดเจน (ภาพประกอบ 9) ดังนั้นจึงได้นำหนูขาวตัวที่ 1 ที่ให้ผลการตอบสนองดีที่สุดมาทำการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาต่อไป



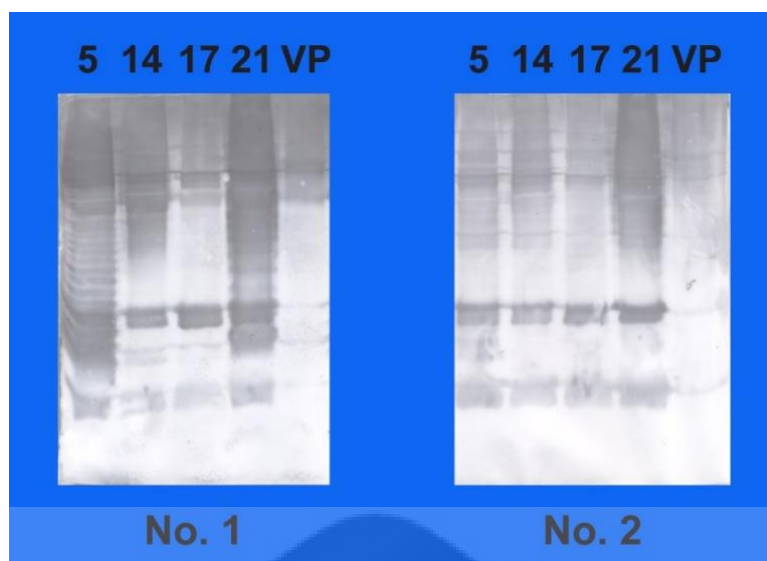
ภาพประกอบ 6 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาว 3 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 21×10^8 ไอโซเลต ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/ml ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มกับแอนติซีรัม จากหนูขาวแต่ละตัว (No.1-3) ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ 1-22 = *P. aeruginosa*, 23 = *P. chlororaphis*, 24 = *P. japonica*, 25 = *P. oleovorans*, 26 = *P. putida*, 27 = *P. stutzeri*, 28 = *P. syringae*, 29 = *A. carviae*, 30 = *A. hydrophila*, 31 = *A. sobria*, 32 = *E. coli*, 33 = *V. anguillarum*, 34 = *V. cholera*, 35 = *V. fluvialis*, 36 = *V. harveyi*, 37 = *V. minicus*, 38 = *V. ordalii*, 39 = *V. parahaemolyticus*, 40 = *V. vulnificus*, วงกลม = ตัวแทนของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูชุดที่ 2, * = จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า PA15 ไม่ใช่เชื้อ *P. aeruginosa* จึงไม่ได้นำมาใช้ในการทดสอบต่อไป



ภาพประกอบ 7 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาว 3 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 21 ไอโซเลต ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *P. aeruginosa* (PA) ไอโซเลต PA2 (2) , PA5 (5), PA8 (8) , PA15 (15) และ *V. parahaemolyticus* (VP) มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วนำไปมกับแอนติซีรั่มจากหนูขาวแต่ละตัว (No.1-3) ลูกศรสีน้ำเงิน = ตัวอย่างแถบของแอนติเจนที่ปรากฏให้เห็นในทุกๆ ไอโซเลตของ *P. aeruginosa*, ลูกศรสีแดง = ตัวอย่างแถบของแอนติเจนที่ปรากฏให้เห็นในบางไอโซเลตเท่านั้นโดยที่ไม่มีปรากฏให้เห็นในไอโซเลตอื่น, * = จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า PA15 ไม่ใช่เชื้อ *P. aeruginosa*



ภาพประกอบ 8 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาว 2 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 8×10^8 ไอโซเลต ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/ml ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปปฏิกิริยากับแอนติซีรัมจากหนูขาวแต่ละตัว (No.1-2) ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ 1-22 = *P. aeruginosa*, 23 = *P. chlororaphis*, 24 = *P. japonica*, 25 = *P. oleovorans*, 26 = *P. putida*, 27 = *P. stutzeri*, 28 = *P. syringae*, 29 = *A. carviae*, 30 = *A. hydrophila*, 31 = *A. sobria*, 32 = *E. coli*, 33 = *V. anguillarum*, 34 = *V. cholera*, 35 = *V. fluvialis*, 36 = *V. harveyi*, 37 = *V. minicus*, 38 = *V. ordalii*, 39 = *V. parahaemolyticus*, 40 = *V. vulnificus*, * = จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า PA15 ไม่ใช่เชื้อ *P. aeruginosa*



ภาพประกอบ 9 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรั่มจากหนูขาว 2 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ PA1, PA4, PA5, PA13, PA14, PA16, PA17 และ PA21 ด้วยวิธี Western blotting โดยนำ *P. aeruginosa* (PA) ไอโซเลต PA5 (5), PA14 (14), PA17 (17), PA21 (21) และ VP มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส นำไปบ่มกับแอนติซีรั่มจากหนูขาวแต่ละตัว (No. 1-2)

2. การผลิตและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

จากการนำหนูขาวชุดที่ 1 ที่มีการตอบสนองดีที่สุดทั้ง 3 ตัว มาผลิตเซลล์ไฮบริโดมาซึ่งภายหลังจากคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่ามี culture media ประมาณ 52 หลุม จากทั้งหมด 2,000 หลุมที่ให้ผลบวก โดยแต่ละหลุมมีโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 1-4 โคลน และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และจากปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* spp. และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวน 12 โคลน ได้แก่ PA108-A2, PA109-C1, PA115-H5, PA201-A5, PA202-C1, PA202-E6, PA204-B12, PA205-A11, PA205-F4, PA208-D11, PA210-H8 และ PA302-A6 ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับบางไอโซเลตภายในสายพันธุ์ (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 10)

สำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจากหนูขาวชุดที่ 2 โดยใช้หนูขาวตัวที่ 1 ที่มีการตอบสนองดีที่สุดที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* ทั้งเซลล์จำนวน 8 ไอโซเลต หลังจากคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในขั้นแรกโดยวิธี dot blotting พบว่ามี culture media ประมาณ 4 หลุม จากทั้งหมด 2,000 หลุม ที่ให้ผลบวก และจากการคัดเลือกในขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และจากปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* spp. และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ พบว่ามีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวน 3 โคลน ได้แก่ PA401-D1, PA403-H8 และ PA408-D10 ที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับบางสปีชีส์ภายในจีนัส *Pseudomonas* (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 10)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการทดลองพบว่าสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* ออกเป็น 2 กลุ่ม (ตาราง 6) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 7 โคลน ได้แก่ PA115-H5, PA204-B12, PA205-A11, PA208-D11, PA302-A6, PA401-D1 และ PA408-D10 ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* บางไอโซเลตที่แตกต่างกัน (ตาราง 6) โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10 A ถึง G) และเมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี Western blotting เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ขนาดต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 โคลนสามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36-309, 50-106, 62-300, 25-195, 14-195, และ 36-140 กิโลดาลตันตามลำดับ ยกเว้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน PA401-D1 ที่ไม่สามารถจับกับแถบแอนติเจนใดๆ ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 11 A ถึง G)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 8 โคลน ได้แก่ PA108-A2, PA109-C1, PA201-A5, PA202-C1, PA202-E6, PA205-F4, PA210-H8 และ PA403-H8 ซึ่งสามารถจับได้อย่างจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ ที่แตกต่างกัน (ตาราง 6) และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับสปีชีส์ต่างๆ ภายในจีนัส

Pseudomonas โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ (ภาพประกอบ 10 H ถึง O) และเมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแต่ละโคลนด้วยวิธี Western blotting เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ขนาดต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 8 โคลนสามารถจับกับแอนติเจนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 48, 60, 12 และ 20, 55-195, 38 และ 42, 13, 28-58 และ 13-36, และ 60-140 กิโลดาลตันตามลำดับ (ภาพประกอบ 11 H ถึง O)

4. การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มที่ผลิตได้ส่วนใหญ่สร้างแอนติบอดีที่มี class และ subclass เป็น IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ และ มีเพียง 5 โคลนที่สร้าง IgM (ตาราง 6)

5. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *P. aeruginosa* โดยวิธี dot blotting

จากการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดด้วยวิธี dot blotting โดยใช้เชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างกัน ได้แก่ PA4, PA5, PA6, PA7, PA10 และ PA12 (คัดเลือกจากผล dot blotting ที่ให้จุดเข้มที่สุด ภาพประกอบ 10) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5×10^6 ถึง 8×10^3 CFU/ml โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี PA408-D10 มีความไวในการตรวจสูงที่สุดประมาณ 8×10^3 CFU/ml (ตาราง 6 และ ภาพประกอบ 12)

ตาราง 6 แสดงสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ

Group	MAbs	Isotype	Bacterial immunoreactivity ^a	Detected antigen by	Sensitivity ^c (CFU/ml)
				Western blot ^b (kDa)	
1	PA115-H5	IgM	PA4, 11, 12, 16, 21	36-309 (LPS)	4×10^4 (PA12)
	PA204-B12	IgG ₃	PA6, 9, 10, 14, 21	50-106 (LPS)	1×10^6 (PA6)
	PA205-A11	IgM	PA11, 12, 20	62-300 (LPS)	1×10^6 (PA12)
	PA208-D11	IgG ₁	PA7, 8, 19	25-195 (LPS)	2×10^5 (PA7)
	PA302-A6	IgG _{2b}	PA7, 8, 18	14-195 (LPS)	1×10^6 (PA7)
	PA401-D1	IgG _{2a}	PA6, 9, 10, 21	-	1×10^6 (PA10)
	PA408-D10	IgG _{2b}	PA6, 9, 10, 14, 21	36-140 (LPS)	8×10^3 (PA10)
2	PA108-A2	IgG _{2a}	PA1-21, PC, PJ, PO, PP, PSt, PSy	48	1×10^6 (PA4)
	PA109-C1	IgG _{2b}	PA1-21, PJ, PO, PP1, PSt, PSy	60	5×10^6 (PA4)
	PA201-A5	IgG _{2b}	PA1-21, PC, PJ, PO, PP, PSt, PSy	12, 20	5×10^6 (PA4)
	PA202-C1	IgM	PA2, 5, 16, PSy	55-195 (LPS)	1×10^6 (PA5)
	PA202-E6	IgG _{2b}	PA1-5, 6-12, 14-21, PC, PJ, PO, PSy	38, 42	5×10^6 (PA4)
	PA205-F4	IgM	PA1-5, 8-11, 13-21, PC, PJ, PO, PP, PSt, PSy	13	5×10^6 (PA4)
	PA210-H8	IgM	PA2, 3, 5, 6, 7, 9, 10-12, 14, 18-21, PSy	28-58 (LPS)	5×10^6 (PA12)
	PA403-H8	IgG _{2b}	PA2, 5, 15, PSy	13-36, 60-140 (LPS)	2×10^5 (PA5)

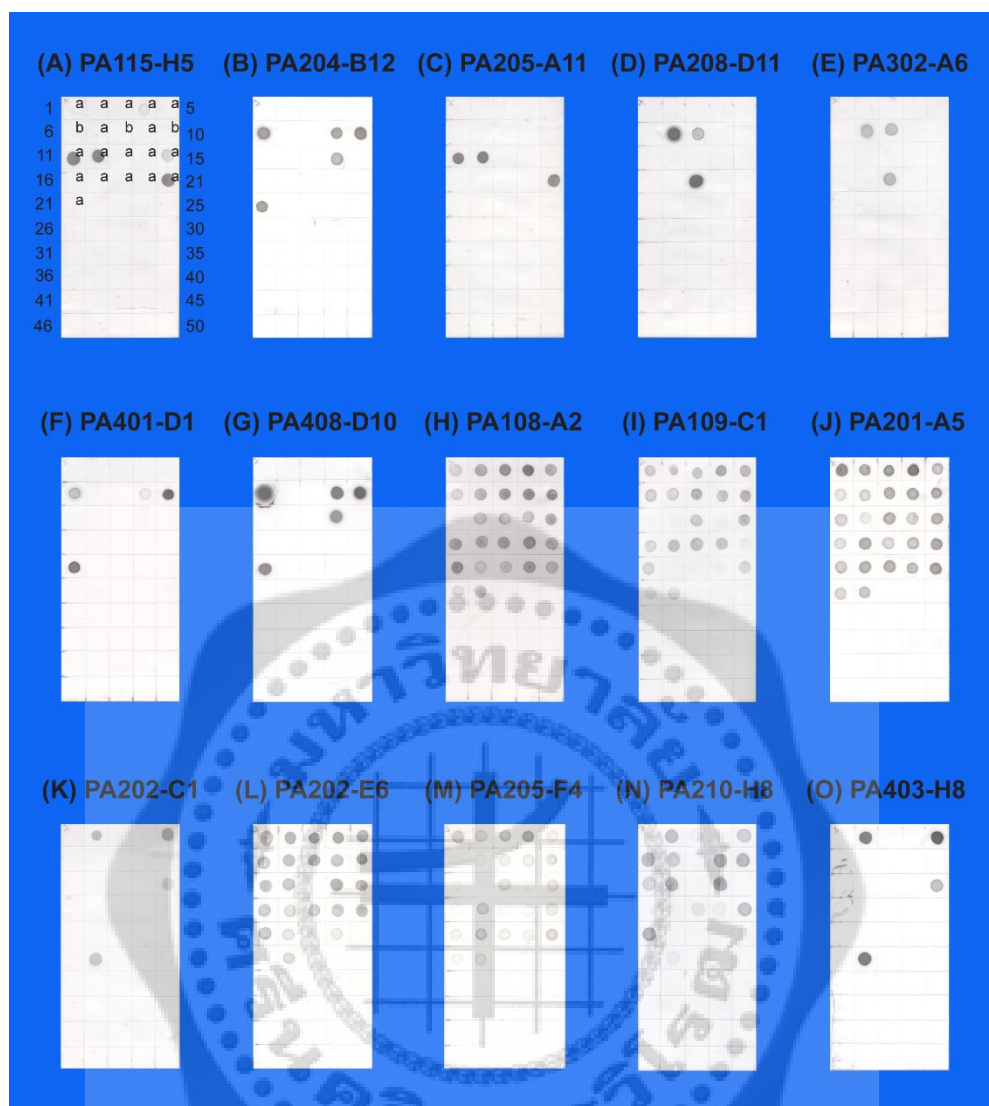
PA = *P. aeruginosa*, PC = *P. chlororaphis*, PJ = *P. japonica*, PO = *P. oleovorans*, PP = *P. putida*, PSt = *P. stutzeri*, PSy = *P. syringae*

^a การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/ml ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ

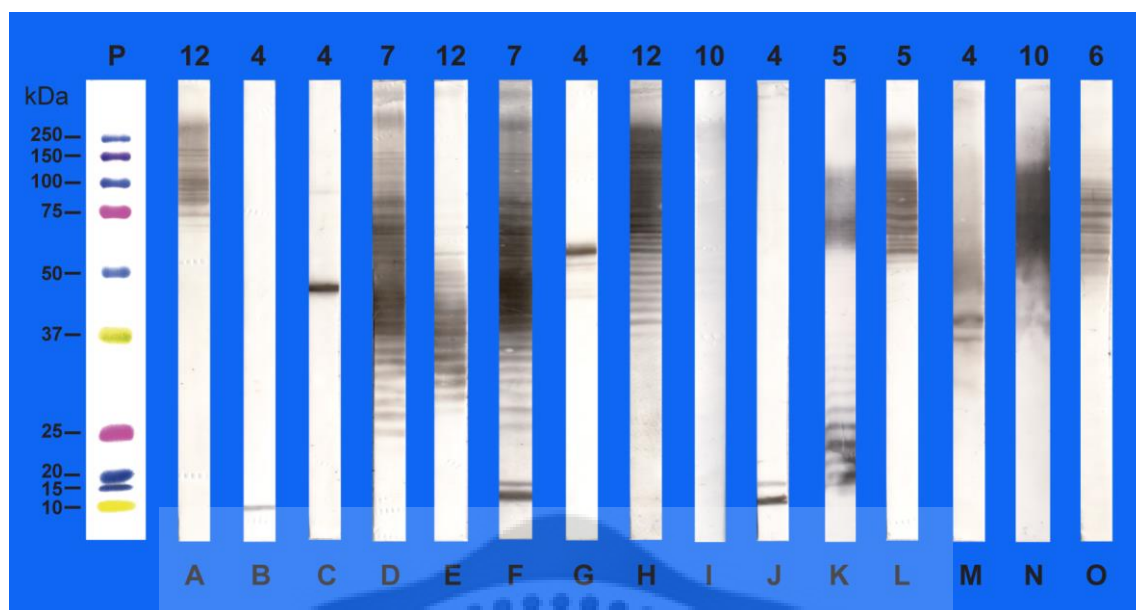
^b การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting โดยนำส่วนผสมของเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ PA1, 4, 5, 7, 12, 13, 15, and 18 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (15% SDS-PAGE) จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสและนำไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่างๆ

^c การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี dot blotting

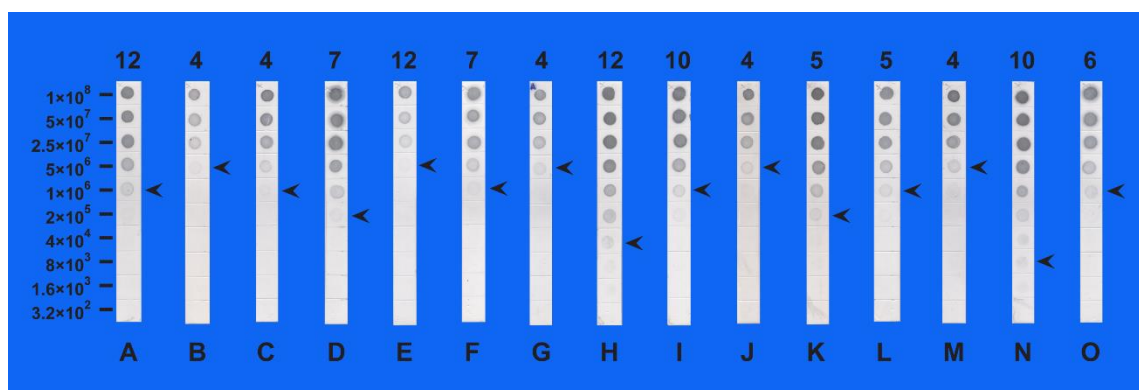
- ไม่สามารถจับกับแถบแอนติเจนใดๆ ได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting



ภาพประกอบ 10 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มต่างๆ (A-O) กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/ml ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปปฏิกิริยาด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ได้แก่ (A) PA115-H5, (B) PA204-B12, (C) PA205-A11, (D) PA208-D11, (E) PA302-A6, (F) PA401-D1, (G) PA408-D10, (H) PA108-A2, (I) PA109-C1, (J) PA201-A5, (K) PA202-C1, (L) PA202-E6, (M) PA205-F4, (N) PA210-H8 และ (O) PA403-H8 ซึ่งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ 1-21 = *P. aeruginosa*, 22 = *P. chlororaphis*, 23 = *P. japonica*, 24 = *P. oleovorans*, 25 = *P. putida*, 26 = *P. stutzeri*, 27 = *P. syringae*, 28 = *A. carviae*, 29 = *A. hydrophila*, 30 = *A. sobria*, 31 = *A. jandii*, 32 = *A. veronii*, 33 = *E. coli*, 34 = *Enterobacter cloacae*, 35 = *Enterococcus* sp., 36 = *Klebsiella pneumonia*, 37 = *Shigella flexneri*, 38 = *Photobacterium damsela* sub *damsela*, 39 = *Photobacterium damsela* sub *piscicida*, 40 = *Proteus vulgaris*, 41 = *V. penaeicida*, 42 = *V. anguillarum*, 43 = *V. cholera*, 44 = *V. fluvialis*, 45 = *V. harveyi*, 46 = *V. minicus*, 47 = *V. ordalii*, 48 = *V. parahaemolyticus*, 49 = *V. vulnificus*, 50 = *Yersinia ruckeri*, a = clinical isolate, b = environmental isolate



ภาพประกอบ 11 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 12 โคลน ด้วยวิธี Western blotting โดยนำเชื้อ *P. aeruginosa* (PA) จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ PA4 (4), PA5 (5), PA6 (6), PA7 (7), PA10 (10) และ PA12 (12) ในรูปแบบเชื้อธรรมชาติที่ทำให้ตายด้วยความร้อนมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (15% SDS-PAGE) จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส และนำไปปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ได้แก่ (A) PA115-H5, (B) PA204-B12, (C) PA205-A11, (D) PA208-D11, (E) PA302-A6, (F) PA401-D1, (G) PA408-D10, (H) PA108-A2, (I) PA109-C1, (J) PA201-A5, (K) PA202-C1, (L) PA202-E6, (M) PA205-F4, (N) PA210-H8 และ (O) PA403-H8, หมายเหตุ เชื้อที่ใช้ในการทดสอบคัดเลือกจากไอโซเลตที่ติดสีเข้มจากการทดสอบด้วยวิธี dot blotting ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน



ภาพประกอบ 12 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา *P. aeruginosa* ด้วยวิธี dot blotting โดยหยด *P. aeruginosa* (PA) ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ PA4 (4), PA5 (5), PA6 (6), PA7 (7), PA10 (10) และ PA12 (12) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 1×10^8 CFU/ml จนถึง 3.2×10^2 CFU/ml ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (1 ไมโครลิตร/จุด) และนำไปปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ (A) PA115-H5, (B) PA204-B12, (C) PA205-A11, (D) PA208-D11, (E) PA302-A6, (F) PA401-D1, (G) PA408-D10, (H) PA108-A2, (I) PA109-C1, (J) PA201-A5, (K) PA202-C1, (L) PA202-E6, (M) PA205-F4, (N) PA210-H8 และ (O) PA403-H8, หัวลูกศร = ความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับได้

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของหนูขาวที่ผ่านการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนรูปแบบต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting พบว่ามีรูปแบบการตอบสนองต่อแอนติเจนของ *P. aeruginosa* ที่แตกต่างกัน ซึ่งการใช้แอนติเจนรูปแบบ formalin fixed form ควบคู่กับ heat-killed form ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันช่วยเพิ่มโอกาสให้หนูขาวสามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่ออีพิโทปต่างๆ ของแอนติเจนได้หลากหลายมากขึ้น การมีอีพิโทปเป็นจำนวนมากทำให้บี-เซลล์ตรวจจับแต่ละอีพิโทปของแอนติเจนส่งผลให้มีการตอบสนองโดยการกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนโคลนและสร้างแอนติบอดีหลายชนิดปะปนอยู่ในแอนติซีรัม (โพลีโคลนอลแอนติบอดี) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนทั้ง 2 ลักษณะโดยวิธี dot blotting พบว่าสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้ง 21 ไอโซเลตและสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นๆ ที่ใช้ทดสอบ และเมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมของหนูแต่ละตัวด้วยวิธี Western blotting เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่มีขนาดต่างๆ สังเกตพบแถบของแอนติเจนบางแถบปรากฏให้เห็นในบางไอโซเลตเท่านั้นโดยที่ไม่มีปรากฏให้เห็นในไอโซเลตอื่น แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังสังเกตพบแถบของแอนติเจนบางแถบที่ปรากฏให้เห็นในทุกๆ ไอโซเลตของ *P. aeruginosa* แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันเหล่านี้มีแอนติเจนชนิดเดียวกันร่วมกันอยู่ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวทั้ง 2 ชุด ด้วยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมของหนูแต่ละตัวมีรูปแบบการตอบสนองต่อแถบแอนติเจนขนาดต่างๆ ของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากแอนติซีรัมที่ใช้ทดสอบมาจากหนูขาวคนละตัว ซึ่งหนูแต่ละตัวมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ที่ไม่เหมือนกัน จึงทำให้ลักษณะความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้มีรูปแบบการตอบสนองที่แตกต่างกันออกไปถึงแม้จะถูกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันก็ตาม โดยหนูขาวทั้ง 3 ตัว ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 21 ไอโซเลต และหนูขาวตัวที่ 1 ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 8 ไอโซเลต ให้ผลการตอบสนองดีที่สุดและพบแถบแอนติเจนเป็นจำนวนมากและชัดเจนกว่าหนูตัวอื่นๆ ดังนั้นจึงนำหนูดังกล่าวมาใช้ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

จากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้หนูขาวที่มีการตอบสนองดีที่สุดทั้ง 3 ตัวที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* ทั้งเซลล์จำนวน 21 ไอโซเลต และหนูขาวตัวที่ 1 ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *P. aeruginosa* จำนวน 8 ไอโซเลต พบว่ามีไฮบริโดมาจำนวน 15 โคลนที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงและแสดงปฏิกิริยาข้ามกับบางไอโซเลตภายในสายพันธุ์เดียวกัน โดยสามารถจำแนกโมโนโคลนอลแอนติบอดีตามความจำเพาะออกเป็น 2 กลุ่มดังนี้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 7 โคลน ได้แก่ PA115-H5, PA204-B12, PA205-A11, PA208-D11, PA302-A6, PA401-D1 และ PA408-D10 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* บางไอโซเลตที่แตกต่างกันโดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามกับ *Pseudomonas* spp. และแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ และเมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี Western blotting เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ขนาดต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จำนวน 6 โคลนสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแอนติเจนในส่วนของ LPS โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี PA115-H5, PA208-D11 และ PA302-D6 สามารถจับกับแถบของโอแอนติเจนที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันได (ladder-like O-antigen bands) ในขณะที่ PA204-B12, PA205-A11 และ PA408-D10 สามารถจับกับแถบของแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high-molecular-weight O-antigen bands; HMW O-antigen) ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ common lipopolysaccharide antigen ของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ โดยการทดสอบด้วยวิธี silver-stained SDS-PAGE และ Western blotting พบว่าโครงสร้าง LPS ของเชื้อ *P. aeruginosa* มีรูปแบบของแถบแอนติเจนแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะตามขนาดของโมเลกุล ได้แก่ high-molecular-weight (HMW) O-antigen bands และ low-molecular-weight (LMW) O-antigen bands โดยส่วนของ HMW O-antigen ที่เชื้อ *P. aeruginosa* สร้างขึ้นประกอบด้วยแอนติเจนที่มีโครงสร้างต่างกัน 2 รูปแบบ ได้แก่ A-band และ B-band ซึ่งโครงสร้างของ A-band มีลักษณะเป็น trisaccharide ที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียวกัน (homopolymer) 3 โมเลกุลเรียงต่อกันเป็นสายยาวประมาณ 70 หน่วย ส่วนโครงสร้างของ B-band นั้นมีลักษณะการจัดเรียงโมเลกุลที่เกิดจากน้ำตาลต่างชนิด (heteropolymer) 2 ถึง 5 โมเลกุล (di to pentasaccharide) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายที่ค่อนข้างยาวกว่า A-band ซึ่งเมื่อสังเกตตำแหน่งของแถบแอนติเจนบนแผ่นเจลพบ B-band อยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่า A-band ในขณะที่แอนติเจนที่มีขนาดเล็กหรือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LMW O-antigen) ประกอบด้วยแถบแอนติเจนที่เป็นส่วนของ core-lipid A ซึ่งพบแถบของแอนติเจนปรากฏอยู่ในตำแหน่งด้านล่างของแผ่นเจล (Cryz; et al. 1984: 508-513; Duchese; et al. 1988: 191-194; Lam; et al. 1989: 962-967; Stanislavsky & Lam. 1997: 243-277) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี PA401-D1 ไม่สามารถจับกับแถบแอนติเจนใดๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting อาจเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวไม่สามารถจับกับแอนติเจนในรูปแบบเสถียรภาพได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ outer membrane protein ของ *V. cholerae* พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จำนวนหนึ่งสามารถจับกับแอนติเจนที่อยู่ในลักษณะของแบคทีเรียทั้งเซลล์และ outer membrane protein ได้ แต่ไม่สามารถจับกับแถบแอนติเจนใดๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก SDS มีผลทำให้โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป โดยอิทธิพลของแอนติเจนอาจหลุดออกจาก bilayer lipid membrane หรืออยู่ในตำแหน่งที่ไม่สามารถเข้าถึงได้ส่งผลให้แอนติบอดีที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถจับได้ (Sciortino; Yang; & Finkelstein. 1985; 122-131) จากความแตกต่างกันของความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 7 โคลนเหล่านี้ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบร่วมกัน (combination) จะสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *P. aeruginosa*

ได้เพียง 13 ไอโซเลตจากทั้งหมด 21 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *P. aeruginosa* แต่ละไอโซเลตที่รวบรวมมาจากแหล่งต่างๆ มีความหลากหลายสูง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Rocchetta และคณะ เมื่อปี ค.ศ. 1999 พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* มีจำนวนซีโรไทป์ (serotype) หลักทั้งหมด 20 ซีโรไทป์ โดยสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างซีโรไทป์ O2, O5, O16, O18 และ O20 ได้เนื่องจากซีโรไทป์ดังกล่าวมีโครงสร้าง LPS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลซ้ำกันและมีการจัดเรียงตัวคล้ายกัน จึงทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เพียงบางไอโซเลตที่มีโครงสร้าง LPS คล้ายคลึงกันเท่านั้น และไม่สามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* แต่ละไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบที่อาจมีซีโรไทป์ที่แตกต่างกันได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 8 โคลน ได้แก่ PA108-A2, PA109-C1, PA201-A5, PA202-C1, PA202-E6, PA205-F4, PA210-H8 และ PA403-H8 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *P. aeruginosa* ไอโซเลตต่างๆ และแสดงปฏิกิริยาข้ามกับสปีชีส์ต่างๆ ภายในجنس *Pseudomonas* โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ และเมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแต่ละโคลนด้วยวิธี Western blotting เพื่อตรวจสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจนที่ขนาดต่างๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแอนติเจนทั้งในรูปแบบของแถบโปรตีนและส่วนของ LPS โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน PA108-A2, PA109-C1, PA201-A5, PA202-E6 และ PA205-F4 สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแถบโปรตีนขนาด 48, 60, 12 และ 20, 38 และ 42, และ 13 กิโลดาลตันตามลำดับ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 2 โคลน ได้แก่ PA202-C1 และ PA210-H8 สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแถบ LPS ในส่วนของ HMW O-antigen bands และ ladder-like O-antigen bands ตามลำดับ ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดี PA403-H8 สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแถบ LPS ทั้งในส่วนของ HMW O-antigen bands และ LMW O-antigen bands ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับแถบแอนติเจนที่เป็นโปรตีนทั้งหมด 5 โคลนสามารถจับกับ *Pseudomonas* spp. ได้เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวสามารถจับได้เป็นโปรตีนที่พบเฉพาะในกลุ่ม pseudomonads ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความอนุรักษ์สูง (strongly conserved) โดยการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับ outer membrane protein ของ *P. aeruginosa* พบว่าโปรตีน H2 (OprL) เป็นโปรตีนที่พบในกลุ่ม pseudomonads ซึ่งมีความอนุรักษ์สูง (Hancock; Siehnel; & Martin. 1990: 1069-1075) อย่างไรก็ตามหากนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่มนี้มาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อร่วมกันคาดว่าจะสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ในระดับจีนัส (genus specific)

ในอนาคตอาจนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มที่ 1 และ 2 ไปใช้ในการผลิตชุดตรวจการติดเชื้อ *Pseudomonas* spp. อย่างง่าย (immunochromatographic strip test) เช่นเดียวกับชุดตรวจ *V. harveyi* โดยสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบเหลือเพียงประมาณ 15 นาที ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือและบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน (Sithigomgul; et al. 2007a: 256-264) ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นของการเกิดโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pseudomonas* (*Pseudomonas* infection) รวมถึงการปนเปื้อนของเชื้อ *Pseudomonas* ในห้องต่างๆ ภายในโรงพยาบาล เครื่องมือแพทย์ หรือแม้แต่อาหารและเครื่องสำอางเพื่อ

ช่วยในการคัดกรองเชื้อที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และตรวจสอบสินค้านำเข้าหรือส่งออกที่สำคัญ อีกทั้งยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Pseudomonas* ซึ่งนำไปสู่การดูแลรักษาและการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะได้ถูกต้อง ครบคลุม รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สำหรับในงานวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างครอบคลุมโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสปีชีส์อื่นๆ ภายในจีนัส *Pseudomonas* ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพิ่มเติมเพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนร่วมระหว่างเชื้อ *P. aeruginosa* ทุกไอโซเลตต่อไป





บรรณานุกรม

- นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบัส. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. หน้า 258-279.
- ไพศาล ลิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ. ศูนย์สื่อเสริม กรุงเทพฯ. หน้า 90-232.
- สมเกียรติ วัฒนศิริชัยกุล; และคนอื่นๆ. (2547). ภาวะติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. เม็ดทรายพริ้นติ้ง. หน้า 1035-1041.
- สำนักเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2555). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รุกควบคุม-ตรวจสอบคุณภาพเครื่องสำอาง. สืบค้นเมื่อ 12 กรกฎาคม 2555, จาก http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/cosmetics/main_index.htm
- อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. (2555). จุลชีววิทยาทางการแพทย์ : แบคทีเรียก่อโรค. กรุงเทพฯ. จรัสสินทวงศ์การพิมพ์. หน้า 226.
- Adam P. B; et al. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology*. 53(4), 1089-1098.
- Allison, J. S; et al. (1985). Electrophoretic preparation and molecular weight characterization of *Pseudomonas aeruginosa* H-antigen flagellins. *Infect Immun*. 49(3): 770-774.
- Anzai, Y.; et al. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 50: 1563-1589.
- Armstrong, J. L.; et al. (1981). Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl Environ Microbiol*. 42(2): 277-283.
- Armstrong, S.; Yate, S. P.; & Merrill, A. R. (2002). Insight into the catalytic mechanism of *P. aeruginosa* exotoxin A strains of toxin interaction with eukaryotic elongation factor. *NZ J Biol Chem*. 29: 227.
- Asboe, D.; et al. (1998). Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS*. 12(14): 1771-1775.
- Austin, B.; & Austin, D. A. (1999). *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish*. 3rd ed. UK. Springer-Praxis, Chichester.
- Ayliffe, G. A. J.; et al. (1974, September) *Pseudomonas aeruginosa* in hospital sinks. *Lancet*. 7: 578-581.

- Ball, G.; et al. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 43: 475-485.
- Barbeau, J.; Gauthier, C.; & Payment, P. (1998) Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: A review. *Can J Microbiol.* 44: 1019-1028.
- Baron, E. J.; & Jones, R. N. (1995). National survey of the vitro spectrum of piperacillin-tazobactam tested against more than 40,000 aerobic clinical isolates from 236 medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 21(3): 141-151.
- Belanger, M; Burrows, L. L; & Lam, J. S. (1999). Functional analysis of genes responsible for the synthesis of the B-band O antigen of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 lipopolysaccharide. *Microbiology.* 145: 3505-3521.
- Bergmans, D. C.; et al. (1998). Cross-contamination with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax.* 53: 1053-1058.
- Bert, F.; (1998). Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infect.* 39: 53-62.
- Bobhammer, J.; (1995). Comparative Hygiene Surveillance of Contamination with *Pseudomonas* in a Cystic Fibrosis Ward over a 4-Year Period. *J Hosp Infect.* 31: 261-274.
- Bodey, G.; et al. (1983). Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 5: 279-293.
- Boyd, A.; & Chakrabarty, A. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 5(3): 162-168.
- Braun, P.; et al. (1998). Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180: 3467-3469.
- Buttery, J. P.; et al. (1998). Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a pediatric oncology ward related to bath toys. *Pediatr Infect Dis J.* 17: 509-513.
- Caballero, E.; et al. (2000). Anti-*Pseudomonas aeruginosa* antibody detection in patients with bronchiectasis without cystic fibrosis. *Thorax.* 56 (9): 669-674
- Cachia, P. J.; & Hodges, R. S. (2003). Synthetic peptide vaccine and antibody therapeutic development: prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biopolymers.* 71: 141-168.
- Charni, N.; et al. (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Applied Environ Microbiol.* 66: 2278-2281.

- Chester, I. R.; Meadow, P. M.; & Pitt, T. L. (1973). The relationship between the O-antigenic lipopolysaccharides and serological specificity in strains of *Pseudomonas aeruginosa* of different O-serotypes. *J Gen Microbiol.* 78: 305-318.
- Cornelis, G. R.; & Van, Gijsegem F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 54: 735-774.
- Crabtree, T. D.; et al. (1999). Trends in nosocomial pneumonia in surgical patients as we approach the 21st century: A prospective analysis. *Am Surg.* 65(8): 706-709.
- Cross, A. S. (1985). Evolving Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 4(2): 156-159.
- Cryz Sj; et al. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* infections. In Orlando. Florida Academic Press. 317-351.
- Curran, B.; et al. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 42: 5644-5649.
- Driscoll J. A.; Brody S. L.; & Kollef M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs.* 67: 351-368.
- Duong, F.; et al. (2001). The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene.* 262: 147-153.
- Edgeworth, J. D.; Treacher, D. F.; & Eykyn, S. J. A (1999). 25-year study of nosocomial bacteremia in an adult Intensive care unit. *Crit Care Med.* 27(8): 1421-1428.
- Elkin, S. & Geddes, D. (2003). Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev Anti Infect Ther Dec.* 1(4): 609-618.
- EL-zaim H. S.; et al. (1998). Protection against exotoxin A (ETA) and *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice with ETA-specific antipeptide antibodies. *Infect Immun.* 66: 5551-5554.
- Engel, J.; & Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Microbiology.* 12: 61-66.
- Faude, U. C. & Hofle, M. G. (1997). Development and application of monoclonal antibodies for in situ detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Applied Environ Microbiol.* 63: 4534-4542.
- Favero, M.; et al. (1971). *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in distilled water from hospitals. *Science.* 173: 836-838.

- Faure, K.; et al. (2003). Effects of monoclonal anti-PcrV antibody on *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury in a rat mode. *J Immune Based Ther Vaccines*. 13:1(1): 2.
- Ferley, J. P.; et al. (1989). Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river recreational waters. *International Int J Epidemiol*. 18(1): 198-205.
- Ferroni, A.; et al. (1998). Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *J Hosp Infect*. 39: 301-307.
- Pittet, D.; et al. (1999). Prevalence and Risk Factors for Nosocomial Infections in Four University Hospitals in Switzerland. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 20(1): 37-42.
- Filloux, A; & Lazdunski. (1998). A. Bacterial protein secretion. *BIOFUTUR*. 68-72
- Folders, J.; et al. (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 182: 1257-1263.
- Fridkin, S. K.; et al. & Project Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) Hospitals. (1999). Surveillance of Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in United States Hospitals: Project ICARE Phase 2. *Clin Infect Dis*. 29: 245-252.
- Ghanei, H, Abeyrathne, PD.; & Lam, JS. (2007). Biochemical characterization of MsbA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 37: 26939-26947.
- Green, S. K.; et al. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*. 28: 987-991.
- Gomez, M. I.; & Prince, A. (2007). Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol*. 7: 244-251.
- Hancock, R. E. W; Siehnel, R.; & Martin, N. (1990). Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol*. 4(7): 1069-1075
- He, Y.; et al. (1996). Monoclonal antibodies for detection of the H7 antigen of *Escherichia coli*. *Applied Envirol Microbiol*. 62: 3325-3332.
- Herwaldt, B. L.; et al. (1991). Waterborne-Disease Outbreaks, 1989-1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 40(SS-3): 1-21.
- Highsmith, K. A.; et al. (1985). Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from whirlpools and bathers. *Infect Control*. 6(10): 407-412.

- Hossain, M. I.; et al. (2006). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in swamps and its infection to *Oreochromis niloticus*. *J Bio-Sci.* 14: 77-78
- Iglewski, B. H.; & Kabat, D. (1975). NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72: 2284-2288.
- Iglewski, B. H.; Liu, P. V.; & Kabat, D. (1977). Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun.* 15: 138-144.
- 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. *Ohio J Sci.* 99(2): 10-15.
- Johnson, J. K.; et al. (2007). Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 45: 3707-3712.
- Khan, N. H.; et al. (2008). Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the ocean. *Appl Environ Microbiol.* 74: 6194-6205.
- Kielhofner M.; et al. (1992). Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 14: 403-411
- Kipnis, E.; Sawa, T; & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et Maladies Infectieuses.* 36: 78-91.
- Kolmos, H. J.; et al. (1993). Outbreak of infection in a burns unit due to *Pseudomonas aeruginosa* originating from contaminated tubing used for irrigation of patients. *J Hosp Infect.* 24(1): 11-21.
- Kramer, M. H.; et al. (1996). Surveillance for waterborne-disease outbreaks-united states, 1993-1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 45(SS-1): 1-33.
- Krothapalli, R.; et al. (1982). *Pseudomonas peritonitis* and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Arch Intern Med.* 142(10): 1862-1863.
- Lam, M. Y. C; et al. (1989). Occurrence of a Common Lipopolysaccharide Antigen in Standard and Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 27(5): 962-967.

- Lam, J. S.; et al. (1992). Monoclonal antibodies as probes to examine serotype-specific and cross-reactive epitopes of lipopolysaccharides from serotype 02, 05, and 016 of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 174: 2178-2184.
- Lam, J. S.; Mac, Donald L. A.; & Lam, M. Y. C. (1987a). Production of monoclonal antibodies against serotype strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 55: 2854-2856.
- Lam, J. S.; et al. (1987b). Production and characterization of monoclonal antibodies against serotype strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 55: 1051-1057.
- Letoffe, S.; Redeker, V.; & Wandersman, C. (1998). Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol Microbiol.* 28: 1223-1234.
- Levine, W. C.; Stephenson, W. T.; & Craun, G. F. (1990). Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 39 (SS-1): 1-13.
- Liu, P. V. (1974). Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 130(Suppl.): S94-S99.
- MacIntyre, S.; McVeigh, T.; & Owen, P. (1986). Immunochemical and biochemical analysis of the polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* vaccine PEV. *Infect Immun.* 51(2): 675-686.
- Manfredi, R.; et al. (2000). *Pseudomonas* spp. complication in patients with HIV disease: an eight-year clinical and microbiological survey. *Eur J Epidemiol.* 16: 111-118.
- Mannafi, A.; et al. (2009). Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. *BMC Microbiology.* 9: 23
- Martinez, A.; Ostrovsky, P.; & Nunn, D. N. (1998). Identification of an additional member of the secretin superfamily of proteins in *Pseudomonas aeruginosa* that is able to function in typeII protein secretion. *Mol Microbiol.* 28: 1235-1246.
- Maschmeyer, G.; & Braveny, I. (2000). Review of the incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19: 915-925.
- Mattick, JS. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol.* 56: 289-314.
- Meynard, J. L.; et al. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* infection in human immunodeficiency virus infected patients. *J Infect.* 38(3): 176-181.

- Noda, Y.; et al. (1992). Analysis of IgA antibody to *Pseudomonas aeruginosa* in sera and sputa of patients with chronic airway disease. *Intern Med.* 31: 575-582.
- Noga, E. J. (2000). Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 2nd ed. Mosby-Year book, Inc: pp. 36616-36622.
- Okino, N.; et al. (1999). Molecularcloning, sequencing, and expression of the gene encoding alkaline ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. Cloning of a ceramidase homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 274: 36616-36622.
- Olson, B.; et al. (1984). Epidemiology of endemic *Pseudomonas aeruginosa*: Why infection control efforts have failed. *J Infect Dis.* 150(6): 808-816.
- Ostroff, R. M.; Vasil, A. I.; & Vasil, M. L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 172: 5915-5923.
- Palleroni, N. J.; et al. (1972). Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *J Bacteriol.* 110 (1): 1-11
- Palleroni, N. J. (2005). Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner, D. J., Krieg, N. R.; & Staley, J. T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. New York, Springer, pp. 323-379.
- Patzer, J.; Walkiewicz, R.; & Dzierzanowska, D. (1986). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized children. *J Antimicrob Chemother.* 18: 45-49.
- Pellett, S.; Bigley, D. V.; & Grimes, D. J. (1983). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecoxsystem. *Appl Environ Microbiol.* 45: 328-332.
- Penny, P. T. (1991). Hydrotherapy pools of the future-the avoidance of health problems. *J Hosp Infect.* 18(supplement A): 535-542.
- Phianphak W.; et al. (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Dis Aquat Org.* 63 (2-3): 161-168.
- Pitt, T. L; et al. (1986). Polyagglutinating and non-typeable strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 21: 179-186.
- Pollack, M. (1984). The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 3: S617-S626.
- Pujana, I.; et al. (1999). Epidemiological analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic bronchiectasis patients without cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 37(6): 2071-2073.

- Rivera-Betancourt, M.; & Keen, J. E. (2000). Murine monoclonal antibodies specific for lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O26 and O111. *Applied Environ Microbiol.* 66: 4124-4127.
- Rocchetta, H. L.; Burrows, L. L.; & Lam, J. S. (1999). Genetics of O-Antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol. Rev.* 63(3): 523-553.
- Romling, U.; et al. (1994). A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol.* 60: 1734-1738.
- Samadpour, M. (2001). *Molecular Typing of Pseudomonas aeruginosa in Distribution Systems*. U.S.A.: AwwaRF and AWWA. 7: 8-12.
- Sciortino, C. V.; Yang, Z. S.; & Finkelstein, R. A. (1985). Monoclonal antibodies to outer membrane antigens of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity.* 49: 122-131.
- Simmons, P. A.; Tomlinson, A.; & Seal, D. (1998). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm in the Attachment of *Acanthamoeba* to Four Types of Hydrogel Contact Lens Materials. *Optometry and Vision Science*, 75(12): 860-866.
- Singer, C.; Kaplan, M. H.; & Armstrong, D. (1977). Bacteremia and fungemia complicating neoplastic disease. A study of 364 cases. *Am J Med.* 62(5): 731-742.
- Sithigorngul, P.; et al. (2000). Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.* 42: 27-34.
- Sithigorngul, W.; et al. (2006). A simple and rapid, immunochromatographic test-strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis Aquat Org.* 72: 101-106.
- Sithigorngul, P.; et al. (2007a). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. *J Microbiol Methods.* 71: 256-264.
- Sithigorngul, W.; et al. (2007b). A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow-head virus (YHV) infection in shrimp. *J Virol Methods.* 140: 193-199.
- Steinstraesser, L. Burkhard, O.; et al. (2005). Burn wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa* triggers weight loss in rats. *BMC Surg.* 17(5): 19.
- Van, Asperen, I. A.; et al. (1995). Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMJ.* 311: 1407-1410.
- Vanholder, R.; Vanhaeke, E.; & Ringoir, S. (1992). *Pseudomonas* Septicemia Due to Deficient Disinfectant Mixing During Reuse. *Int J Artif Organs.* 15(1): 19-24.

- Vostrugina, K.; Gudaviciene, D.; & Vitkauskiene, A. (2006). Bacteremias in patients with severe burn trauma. *Medicina*. 42(7): 576-579.
- Wiener-Kronish, J. P.; et al. (1993). Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol*. 75: 1661-1669.
- Wilderman, P. J.; et al. (2001). Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 69: 5385-5394.
- Winotaphan, P.; et al. (2005). Monoclonal antibodies specific to hemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol*. 18: 189-198.
- Yamashita, S. K.; et al. (2000). Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. *Can J Infect Dis*. 11(2): 107-111.
- Yamashita, M.; et al. (2010). A specific serum IgA antibody discriminates pneumonia from colonization state patients with *Pseudomonas aeruginosa* in sputum culture. *J Microbiol Methods*. 82: 198-204.





อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกชอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.00	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.00	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	2.50	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.50	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.3 ± 0.2		

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกชอย (Tryptic soy agar)

ทริปโตน (Tryptone)	17.00	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.00	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	2.50	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.50	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 7.3 ± 0.2		

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

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.00	กรัม
โปรตีนเปปโตเน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.00	กรัม
โซเดียมซิเตรท ($HOC(COONa)(CH_2COONa)_2$)	10.00	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	10.00	กรัม
ออกซ์กอล (Oxgall)	8.00	กรัม
แซคคาไรส (Saccharose)	20.00	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.00	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท ($C_6H_5O_7Fe \cdot 5H_2O$)	1.00	กรัม

บรอมไธมอลบลู (Bromthymol blue)	0.04	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.00	กรัม
น้ำกลั่น	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเป็น 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	มิลลิลิตร

2. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

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

3. Merthiolate เข้มข้น 1%

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



ภาคผนวก ค

สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4000	กรัม
ดี-กลูโคส (D-glucose) (Sigma)	3.6000	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	5.5925	กรัม
(N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma)		
เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)	20,000	units
สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)	200.00	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000.00	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 20%

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

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

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

4. สารละลายสำหรับหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol เข้มข้น 40%)

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

5. สารละลายสำหรับแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethylsulfoxide เข้มข้น 12%)

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





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	มิลลิลิตร
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	มิลลิลิตร
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	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.1 N		

1.4 SDS เข้มข้น 10%

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)	50.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น10% (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

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

1.7 2 X Treatment buffer

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

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel**2.1 การเตรียม separating gel สำหรับ SDS-PAGE 15% gel (15% T 2.7% C_{BIS})**

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15.00	มิลลิลิตร
tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	7.50	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10% (1.4)	0.30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10% (1.5)	150.00	ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	20.00	ไมโครลิตร

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

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66	มิลลิลิตร
tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.00	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10% (1.4)	0.20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.20	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (1.5)	100.00	ไมโครลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร

ตาราง ส่วนผสมพอลิอะครีลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15% T 2.7% C _{BIS}	4% T 2.7% C _{BIS}
30% T 2.7% C _{BIS}	15.0 มิลลิลิตร	2.66 มิลลิลิตร
tris-Cl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มิลลิลิตร	
tris-Cl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)		5.0 มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10%	0.3 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.75 มิลลิลิตร	12.2 มิลลิลิตร
ผสมและใช้ปั๊มสุญญากาศดึงอากาศออกจากสารละลาย		
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (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	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

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	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
เมทานอล	250.0	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1

เมทานอล	500.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2

เมทานอล	50.0	มิลลิลิตร
กรดอะซีติก	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อมและล้างเจล

ถอดเจลจากกระดาษในสี Coomassie blue (4.1.2) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ล้างเจลในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30-60 นาที จนเห็นแถบโปรตีน 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 blotting

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





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) เคลือบภาชนะหลุม 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง

2) สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3) เติมนิโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1:20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว 1-12 ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 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 ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8) ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้งๆ 10 นาที

- 9) เติมสารละลาย substrate ซึ่งประกอบด้วย o-phenylenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 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





บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. สารละลาย Blotto เข้มข้น 5%

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

2. สารละลาย 0.5% Blotto

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

3. Citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

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

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

กรดซัลฟูริก (เข้มข้น)	27.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

5. O-Phenylenediamine (OPD)



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายณโรตม แพนไธสง
วันเดือนปีเกิด	12 กรกฎาคม 2530
สถานที่เกิด	นครราชสีมา
สถานที่อยู่	บ้านเลขที่ 74-75 หมู่ 15 ถนนนิเวศน์รัตน์ ตำบลประทาย อำเภอประทาย จังหวัดนครราชสีมา 30180
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยนักวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หน่วยวิจัยโรคไข้เลือดออก อาคารเฉลิมพระเกียรติ ๘๐ พรรษา ๕ ธันวาคม ๒๕๕๐ (ศูนย์วิจัยการแพทย์ศิริราช SiMR) โรงพยาบาลศิริราช
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2545	ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนประทาย นครราชสีมา
พ.ศ. 2548	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนบุญวัฒนา นครราชสีมา
พ.ศ. 2552	วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2556	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร