

รายงานวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจแบบแถบสีสำหรับเชื้อ
Vibrio parahaemolyticus และ *V. vulnificus*

โดย

ศิวาพร ลงยันต์¹, ปริณทร์ ชัยวิสุทธิธำรงกูร¹,
ภัทริน ศรีดุลย์กุล¹, สมบัติ รักประทานพร² และไพศาล สิทธิกรกุล¹

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²ศูนย์ความเป็นเลิศทางเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ณ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2552

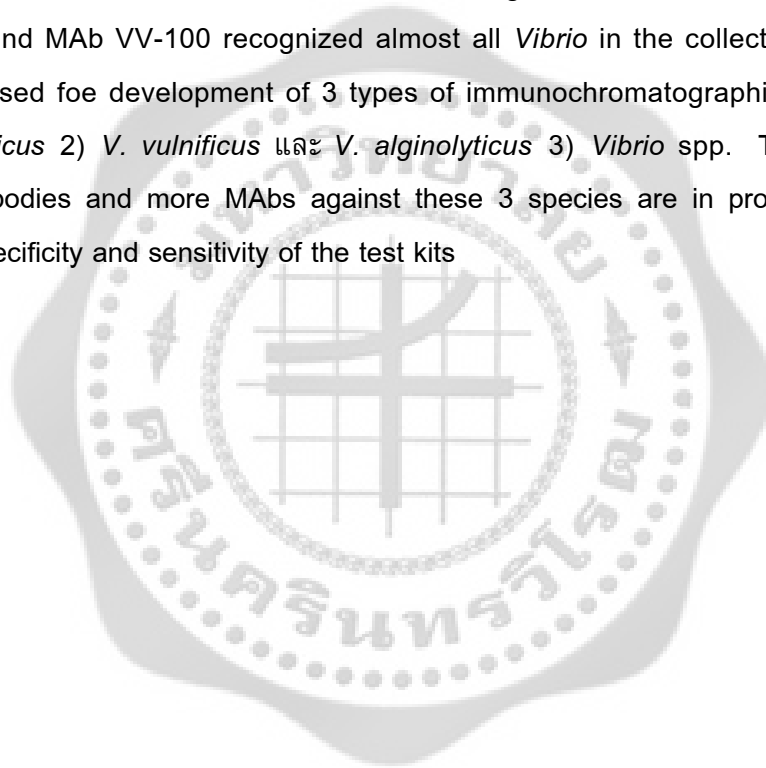
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยใช้แบบที่เรียแต่ละชนิดๆ 5 isolates ผสมกันในการปลูกภูมิคุ้มกัน พบว่า MAb ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. parahaemolyticus* มีความจำเพาะกับ *V. parahaemolyticus* เฉพาะบาง isolate เท่านั้น MAb ที่มีความจำเพาะกว้างมักมีปฏิกิริยาข้าม *V. alginolyticus* มีเพียง 2 โคลนได้แก่ VP-11B9 และ VP-618 ที่สามารถจับกับ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ได้ ซึ่งเมื่อรวมกันแล้วสามารถจับกับ *V. parahaemolyticus* ได้ทั้งหมด (28 isolates) ส่วนหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วย *V. vulnificus* ก็เช่นเดียวกัน MAb ส่วนใหญ่จับกับ *V. vulnificus* ได้เพียง 1-2 isolate มี MAb VV-158 ที่สามารถจับกับ *V. vulnificus* 5/13 isolate, MAb VV-165 ที่จับ *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* ได้ทุก isolate และ MAb VV-100 สามารถจับกับ *Vibrio* spp. ส่วนใหญ่ได้ ดังนั้นจึงคาดว่าจะสามารถนำ MAb เหล่านี้มาพัฒนาชุดตรวจแบบแถบสี strip test ได้ 3 ชุดสำหรับตรวจ *Vibrio* ต่างๆ คือ 1) *V. parahaemolyticus* 2) *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* 3) *Vibrio* spp. ในขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการผลิต polyclonal antibody (PAb) จำเพาะต่อ *Vibrio* ทั้ง 3 ชนิดและผลิต MAb เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ MAb ที่มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้นต่อไป

Abstract

Monoclonal antibodies (MAb) against *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were generated by immunization into mice with combination of 5 isolates of each bacterial species. Most MAb obtained from mouse immunized with *V. parahaemolyticus* demonstrated narrow specificity. Most of them recognized few isolates of *V. parahaemolyticus* and the broad specific MAb usually recognized *V. alginolyticus* as well. Combination of two broad specific MAbs (VP-11B9 and VP-618) recognized all isolates of *V. parahaemolyticus*. Similar results were obtained from mice immunized with *vulnificus*. Most MAbs recognize only few isolates, only MAb VV-158 recognized 5 of 13 *V. vulnificus*. MAb VV-165 recognized all isolates of *V. vulnificus* and *V. alginolyticus* and MAb VV-100 recognized almost all *Vibrio* in the collection. These MAbs are potentially used for development of 3 types of immunochromatographic strip test for 1) *V. parahaemolyticus* 2) *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* 3) *Vibrio* spp. The production of monoclonal antibodies and more MAbs against these 3 species are in progress in order to maximize the specificity and sensitivity of the test kits



ประกาศคุณูปการ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2552 สำหรับอุดหนุนการทำวิจัยในโครงการนี้ ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่สำหรับการศึกษาค้างนี้ รวมทั้งสถาบันต่างๆ และเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างแบคทีเรียชนิดต่างๆ และตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อสำหรับใช้ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี



สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการทดลอง	18
สรุปและอภิปรายผล	29
บรรณานุกรม	31



บัญชีตาราง

ตารางที่		หน้า
1	List of bacterial isolates and sources used in this study.....	12
2	Specificity of monoclonal antibodies against <i>V. parahaemolyticus</i>	20
3	สรุปความจำเพาะของ MAb against <i>V. parahaemolyticus</i> ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็น strip test ได้.....	23
4	Specificity of monoclonal antibodies against <i>V. vulnificus</i>	25
5	สรุปความจำเพาะของ MAb against <i>V. vulnificus</i> ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็น strip test ได้.....	28

รูปที่		หน้า
1	Cross-reactivity of MAbs against <i>V. parahaemolyticus</i> assayed by dot blotting.....	21
2	Cross-reactivity of MAbs against <i>V. vulnificus</i> assayed by dot blotting.....	26

บัญชีภาพประกอบ



โรค vibriosis เป็นการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ต่างๆ นอกจากเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารให้แก่มนุษย์แล้ว การติดเชื้อ *Vibrio* spp. ต่างๆ ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ก่อให้เกิดการตายและความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมากโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะ *Vibrio harveyi* ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งวัยอ่อนและกุ้งในฟาร์มกุ้ง *Penaeus* ชนิดต่างๆ เช่น กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งญี่ปุ่น (*P. japonicus*) ซึ่งมีการระบาดทั่วไปในประเทศออสเตรเลีย (Pizzutto and Hirst, 1995) ไทย (Jiravanichpaisal et al., 1994) ซึ่งนอกจากกุ้งแล้ว *Vibrio* spp. ต่างๆ ยังก่อให้เกิดโรคในปลาทะเล ปลาทะเล ปลาน้ำจืด และหอย (Alvarez et al., 1998) *Vibrio* อื่นๆ ที่พบในประเทศไทยได้แก่

V. parahaemolyticus ซึ่งพบการติดเชื้อรุนแรงในหอยนางรม หอยแมลงภู่ และเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคอาหารเป็นพิษก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในมนุษย์ซึ่งพบการระบาดทั่วโลก (McCarter, 2001) ดังนั้นการปนเปื้อนของ *V. parahaemolyticus* จึงจำเป็นต้องมีการตรวจในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกอย่างเข้มงวด

V. vulnificus พบการติดเชื้อในกุ้ง (Longyant et al., 2008) ปลาไหลและก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในมนุษย์ (Amaro et al., 1992)

การควบคุมป้องกันการระบาดของ *Vibrio* spp. ต่างๆ ในฟาร์มและบ่อเลี้ยงตลอดจนการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจำเป็นต้องทราบชนิดของแบคทีเรียเพื่อการรักษาและการป้องกันที่เหมาะสม ซึ่งการพิสูจน์ทราบชนิดของ *Vibrio* spp. ต่างๆ นอกจากจะดูลักษณะการเจริญใน selective media ชนิดต่างๆ ประกอบกับ biochemical test ต่างๆ (Liu et al., 1996) ซึ่งใช้เวลาและแรงงานค่อนข้างมากแล้ว ลักษณะที่คาบเกี่ยวกันระหว่าง *Vibrio* spp. ต่างๆ ทำให้อาจพิสูจน์ทราบชนิดผิดพลาดได้ (Alcaide et al., 2001) การใช้ molecular probe labeled oligonucleotide หรือหาลำดับของ 16S ribosome (Tsukamoto et al., 2006) สามารถใช้ได้ดี แต่ต้องทำควบคู่กับ biochemical test จึงจะสามารถแยก *Vibrio* spp. ชนิดต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดแยกจากกันได้ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและเสียเวลา

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ต่อองค์ประกอบต่างๆ ของแบคทีเรีย สามารถคัดเลือก MAb ที่จำเพาะต่อ unique epitope ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้โดยการคัดเลือกทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียที่มีลักษณะใกล้เคียงทำให้สามารถคัดเลือก MAb ที่มีความจำเพาะสูง สามารถจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้ ซึ่งมีรายงานการผลิต MAb ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *E. coli* (He et al., 1996; Rivera-Betancourt and Keen, 2000) *Bacillus cereus* (Charni et al., 2000) สปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* (Quinlan and Foegeding, 1997) การผลิตและใช้ MAb ในการจำแนกแบคทีเรียในน้ำ (Faude and Hofle, 1997) เป็นต้น ซึ่ง MAb เหล่านี้สามารถใช้จำแนกแบคทีเรียต่างๆ โดยมีความจำเพาะและแม่นยำสูงแล้วยังสามารถปรับรูปแบบการทดสอบให้ทำได้สะดวกและรวดเร็วได้ เช่น dot blotting และ sandwich ELISA รูปแบบต่างๆ เนื่องจากการผลิตแอนติบอดีในรูป MAb ซึ่งสร้างโดย cell line ถาวรจึงสามารถผลิตแอนติบอดีปริมาณมากเท่าที่ต้องการในราคาไม่แพงมาก หลังจากสามารถคัดเลือก clone ของ hybridoma ที่ต้องการได้แล้ว

สำหรับการสร้าง MAb ต่อ *Vibrio* spp. มีรายงานการผลิตใน *V. cholerae* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคหิวาห์ในมนุษย์ โดยผลิต MAb ต่อ non O-1 heat stable toxin (Takeda et al., 1990) และ non membrane-damaging cytotoxin (Saha and Nair, 1997) ซึ่ง MAb ดังกล่าวนี้อาจมีปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนในแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย ได้แก่ *Yesinia enterocolitica* (MAb ชุดแรก) *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas* spp., *Shigella* spp. เป็นต้น (MAb ชุดที่สอง) ดังนั้นการผลิต MAb ต่อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จะใช้วิธีการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรียทั้งเซลล์ แล้วคัดเลือกเฉพาะ MAb ที่จำเพาะต่อ *Vibrio* แต่ละ species โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. หรือแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกชนิดต่างๆ และจากการทดลองผลิต MAb ต่อ *V. harveyi* นั้นสามารถผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* spp. ชนิดอื่นๆ และแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกชนิดต่างๆ นอกจากนี้ MAb ที่ได้บางชนิดยังมีแนวโน้มจะแยกสายพันธุ์ต่างๆ ของ *V. harveyi* ได้ด้วย (Phianphak et al., 2005) ซึ่ง MAb บางตัวสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจอย่างง่าย (strip test) ที่สามารถใช้โดยเกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปและให้ผลแม่นยำภายในเวลารวดเร็ว (15 นาที) โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือเพิ่มเติม (Sithigorngul et al., 2007a)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะเป็นการสร้าง MAb จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เพิ่มขึ้นจากที่เคยได้รับทุนสนับสนุนในงบประมาณประจำปี 2548 ซึ่งสามารถผลิต MAb จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้อย่างละ 3 สายพันธุ์ ซึ่ง MAb ที่ได้ดังกล่าวยังไม่ครอบคลุมที่จะใช้ตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ได้ทุกสายพันธุ์เนื่องจาก *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* มีความหลากหลายมากจึงต้องทำการรวบรวมสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อทั้งสองชนิดนี้เพิ่มเติมทั้งจากที่ติดเชื้อในสัตว์น้ำและในคนเพื่อนำมาผลิต MAb ให้ครอบคลุมสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ก่อโรคเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นเครื่องมือสำหรับพิสูจน์ทราบและจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ต่างๆ ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำและในคนหรืออาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และมีผลต่อการส่งสินค้าออก ซึ่งหลังจากที่ได้ MAb และคัดเลือก MAb ที่เหมาะสมแล้วก็นำมาพัฒนาประกอบเป็นชุดตรวจแบบแถบสี strip test ซึ่งเป็นชุดตรวจที่มีความสะดวกในการใช้เพื่อให้เกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้สะดวกและแม่นยำสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อชนิดนี้ต่อไปเช่นเดียวกับชุดตรวจไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงดวงขาวและแบคทีเรีย *V. harveyi* (Sithigorngul et al., 2006, 2007 a, b)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง



Vibrio parahaemolyticus

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบได้ทั่วไปในน้ำสามารถแยกได้จากตะกอนอาหารทะเล เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ และปลาต่างๆ (Vuddhakul et al., 2000; Baffone et al., 2005) การรับประทานอาหารทะเลดิบหรือปรุงไม่เหมาะสมเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วงในมนุษย์โดยมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Chan et al., 1989, Kaufman et al., 2002; Zhang and Austin, 2005) นอกจากนี้การติดเชื้อ *Vibrio* (vibriosis) ในกุ้งก่อให้เกิดการระบาดและเสียชีวิตจำนวนมากมักเกิดจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ร่วมกับ *Vibrio* ชนิดต่างๆ (Liu et al., 1996; Sung et al., 2001) นอกจากนี้ *V. parahaemolyticus* ยังพบการติดเชื้อในหอยเป๋าฮื้อ (abalone) ที่เป็นโรคกล้ามเนื้อเน่าเปื่อย (Withering syndrome) (Lui et al., 2000; 2001) ซึ่งจากการทำให้หอยเป๋าฮื้อติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากคนท้องร่วงหรือแยกจากหอยที่ติดเชื้อล่วงหน้าก่อให้เกิดการตายของหอยเป๋าฮื้อ (Lee et al., 2003)

การตรวจสอบการติดเชื้อ *Vibrio* โดยปกติทำโดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ แยกเชื้อและพิสูจน์ทราบชนิดโดยกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ มากมาย ซึ่งเชื้อ *Vibrio* หลายชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกับ *V. parahaemolyticus* จึงต้องอาศัยวิธีการต่างๆ ที่น่าเชื่อถือมาประกอบการพิสูจน์ทราบ (Gopal et al., 2005; Yam et al., 1999) ซึ่งกระบวนการนี้สิ้นเปลืองแรงงาน เวลา และมีความไวต่ำ การพัฒนาการตรวจสอบโมเลกุลจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* เช่น thermostable direct haemolysin (TDH) และ TDH related haemolysin (TRH) โดยวิธี ELISA (Honda et al., 1995) polymerase chain reaction (PCR) ของ *toxR*, *tolh* *trh* genes (Kim et al., 1999; Kaufman et al., 2002; Gopal et al., 2005) แต่วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดที่แอนติบอดียังไม่มีการจำหน่ายทางการค้าและวิธีการทางอณูชีววิทยามีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างค่อนข้างสูง ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทาง นอกจากนี้วิธีการเหล่านี้ยังไม่สามารถใช้ตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไปได้เนื่องจาก *tdh* gene และหรือ *trh* gene มักพบใน *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคในคน (Kaufman et al., 2002; Osawa et al., 2002)

Vibrio vulnificus

V. vulnificus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบในน้ำทะเลซึ่งก่อโรคในปลา (Esteve-Gassent et al., 2003) กุ้ง (Sung and Song, 1996) และในมนุษย์ โดยติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือดมีผลทำให้เสียชีวิตได้ ซึ่งสาเหตุการติดเชื้ออาจเกิดจากการบริโภคอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อน (Bender and Romig, 2004; Summer and Ross, 2002) หรืออาจติดเชื้อทางบาดแผลที่สัมผัสกับน้ำทะเล หรือสัมผัสกับปลาหรือหอย ปูที่ติดเชื้ออยู่ (Petel et al., 2002; Midturi et al., 2005) *V. vulnificus* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Biotype) ชนิดของสัตว์ที่ติดเชื้อและการสร้าง indole (Linkous and Oliver, 1999) serotype ต่างๆ (Biosca et al., 1996) หรือลักษณะทางพันธุกรรมของโมเลกุลต่างๆ (Ripabelli et al., 1999) สำหรับ *V. vulnificus* ใน Biotype 1 เป็นกลุ่มที่ก่อโรคในมนุษย์ แต่ใน Biotype 2 ก่อ

โรคในปลา และ Biotype 3 ก่อให้เกิดโรคทั้งคนและปลา (Amaro and Biosca, 1996; Biosca et al., 1997a)

การพิสูจน์ทราบชนิดของ *V. vulnificus* อาศัย selective media และกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ มากมาย ซึ่งเสียค่าใช้จ่ายสูงและเสียเวลามาก และยังคงต้องอาศัยกระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยาและอณูวิทยาในการยืนยันผลการพิสูจน์ชนิด (Cerdá-Cue'lla et al., 2000; Biosca et al., 1996) โดย Biotype ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในปลาไหลและให้ผลลบต่อ indole reaction มีลักษณะทางซีรัมเหมือนกัน ในขณะที่ Biotype 1 ก่อให้เกิดโรครุนแรงในคนให้ผลบวกกับ indole และมีลักษณะทางซีรัมแตกต่างกันมาก (Biosca et al., 1997b) จากรายงานการผลิต MAb 5 ชนิดจำเพาะต่อ lipopolysaccharide (LPS) สามารถจำแนก *V. vulnificus* 17 isolates ออกได้ 6 serovar โดยแต่ละกลุ่มไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามระหว่างกลุ่ม ในขณะที่ antiserum ไม่สามารถใช้จำแนกกลุ่มของ *V. vulnificus* เหล่านี้ออกได้จากกัน (Martin and Siebeling, 1991) ดังนั้นการใช้ MAb ในการพิสูจน์และตรวจหา *V. vulnificus* น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมเนื่องจากมีความจำเพาะต่อ epitope เพียงตำแหน่งเดียวซึ่งจะสามารถแยก *V. vulnificus* กลุ่มต่างๆ ออกจากกันได้

การศึกษาการระบาดของ *V. vulnificus* ในประเทศไทยมีน้อยมากเนื่องจาก *V. vulnificus* มีลักษณะคล้ายกับ *Vibrio* ชนิดต่างๆ มากและไม่มีเครื่องมือที่จะใช้พิสูจน์ทราบได้ชัดเจน รายงานการระบาดในปลากะพงขาว (*Lates calcarieer*) สามารถแยก *V. vulnificus* ได้ 2 isolates (Barnette personal communication) และในกุ้งขาวสามารถแยก *V. vulnificus* ได้ 3 isolates (Longyant et al., 2008) ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาการระบาดของ *V. vulnificus* ทำได้ง่ายขึ้นโดยเกษตรกรและเพื่อการตรวจสอบและลดการติดเชื้อ *V. vulnificus* การผลิต MAb เพิ่มเติมให้ครอบคลุมการจับ *V. vulnificus* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อใช้พัฒนาชุดตรวจแบบสะดวกใช้แบบ strip test จึงเป็นวิธีที่สามารถผลิตเครื่องมือที่สามารถใช้ได้โดยเกษตรกรและบุคลากรทางการแพทย์เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อในผู้ป่วยและตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *V. vulnificus* ในอาหารทะเลเพื่อป้องกันการติดเชื้อและตรวจเชื้อปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกต่างประเทศได้ด้วย

ในงานวิจัยวิจัยครั้งนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ (isolate) ต่างๆ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและพิสูจน์ทราบการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงและนำมาพัฒนาต่อเป็นชุดสะดวกใช้แบบ strip test ซึ่งทราบผลรวดเร็ว โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใดๆ ใช้ได้โดยเกษตรกรหรือบุคลากรในห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญ ซึ่งนอกจากจะใช้ในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแล้วยังสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อชนิดนี้ในคนไข้ และการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* นี้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยตรง

วิธีดำเนินการวิจัย



1. การเตรียมและการรวบรวมแบคทีเรีย

ทำการรวบรวมแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. ชนิดอื่นๆ, *Aeromonas* spp. และแกรมลบชนิดต่างๆ จากสัตว์น้ำต่างๆ เช่น กุ้ง ปลา และจากคนป่วยโรคท้องร่วง เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาวและทดสอบปฏิกิริยาข้ามดังนี้ (ตารางที่ 1)

1. *V. parahaemolyticus* 28 isolates
2. *V. vulnificus* 13 isolates
3. *Vibrio harveyi* 30 isolates
4. *V. campbellii* 3 isolates
5. *V. mimicus* 10 isolates
6. *V. cholerae* 25 isolates
7. *V. alginolyticus* 13 isolates
8. *V. fluvialis* 7 isolates
9. *V. penaeicida* 1 isolate
10. *V. ordalii* 1 isolate
11. *V. anguillarum* 1 isolate
12. *V. shilonii* 1 isolate
13. *Aeromonas hydrophila* 20 isolates
14. *A. sobria* 17 isolates
15. *A. caviae* 10 isolates
16. *A. veronii* 1 isolate
17. *A. jandaei* 1 isolate
18. *Plesiomonas shigelloides* 3 isolates
19. แบคทีเรียแกรมลบอีก 10 ชนิดๆ ละ 1 isolate

2. Identification of *Vibrio* spp.

ตรวจสอบชนิดของ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดย Biochemical test ต่างๆ และ 16s ribosome gene เพื่อยืนยันความถูกต้องของ *Vibrio*

3. การเตรียมแอนติเจน

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียใน tryptic soy agar (TSA) ที่เสริมด้วย NaCl 2% สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ประมาณ 24 ชม. ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้น OD = 1 ที่ 680 nm ซึ่งเทียบกับจำนวนแบคทีเรียประมาณ 8×10^8 CFU/ml แยกเป็น 3 ส่วนคือ 1) ทำเป็น stock โดยผสม 1.5 % glycerol เก็บที่ -70°C 2) นำไปฆ่าเชื้อที่ 60°C เป็นเวลา 60 นาทีแบ่งเป็นส่วนๆ เก็บไว้ที่ -20°C 3)

นำไปทำให้เสียสภาพโดยผสมกับ 2 X treatment buffer (4% SDS และ 10% mercaptoethanol) ที่อัตราส่วน 1:1 และต้มเป็นเวลา 1 นาทีหรือผสมด้วย formalin 10% จากนั้นนำไป dialyzed ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 12 ชม.

4. การผลิต MAb

4.1 การปลูกภูมิคุ้มกัน

ใช้หนูขาว 4 ตัวฉีดสารผสมของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ทำให้เสียสภาพและปกติโดยผสมกับ complete Freud's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal cavity) และฉีดซ้ำอีก 3 ครั้งทุกๆ 2 สัปดาห์โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant หลังการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือด serum มาตรวจสอบการสร้างแอนติบอดีโดยวิธี Western blotting

4.2 การผลิต hybridoma

การผลิต hybridoma ทำตามวิธีของ Köhler and Milstein (1976) และ Mosmann et al. (1979) โดยคัดเลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด มาเตรียมเซลล์จากม้าม (spleen) และนำมาเชื่อมรวมกับ P3X myeloma โดย polyethylene glycol เลี้ยงใน selective media (HAT medium) ใน 96 well culture plate จำนวน 30 plate หลังจากตรวจคัดเลือกโคลนของเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการได้โดยวิธีต่างๆ แล้วนำมา reclone ให้แน่ใจว่าเป็น monoclonal โดยวิธี limited dilution โคลนที่ได้นำมาเก็บไว้ใน liquid nitrogen เพื่อใช้ในการทดสอบและผลิตแอนติบอดีต่อไป

5. วิธีการตรวจสอบคัดเลือก hybridoma

ทำการคัดเลือก hybridoma clone ที่สร้าง MAb จำเพาะต่อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ขั้นตอนแรกโดย dot blotting จากนั้นนำมาคัดเลือกต่อโดยวิธี immunohistochemistry และ Western blotting

5.1 Dot blotting

นำ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. vulnificus* ชนิดที่ใช้ immunize ทั้งสภาพที่ปกติและถูกทำให้เสียสภาพผสมกัน 1:1 ความเข้มข้นประมาณ 10^6 cell/ml นำมาหยดบน nitrocellulose membrane อบที่ 60 °C นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จาก hybridoma ในแต่ละหลุม หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 % blotto นำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP; Biorad) เจือจาง 1 : 1000 ล้างใน 0.5 % blotto และใส่สารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03 % diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เลือก hybridoma clone ที่แสดงปฏิกิริยาต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบโดยเลือกโคลนที่ให้สีเกิดขึ้นบน nitrocellulose membrane ที่มีความเข้มกว่าจุดควบคุม (ไม่ได้บ่ม MAb) นำมาคัดเลือกต่อโดย dot blotting กับแบคทีเรียชนิดต่างๆ Western blotting และ immunohistochemistry ก่อนนำไป reclone และ cryopreservation สำหรับการศึกษาต่อไป

5.2 SDS-PAGE และ Western blotting

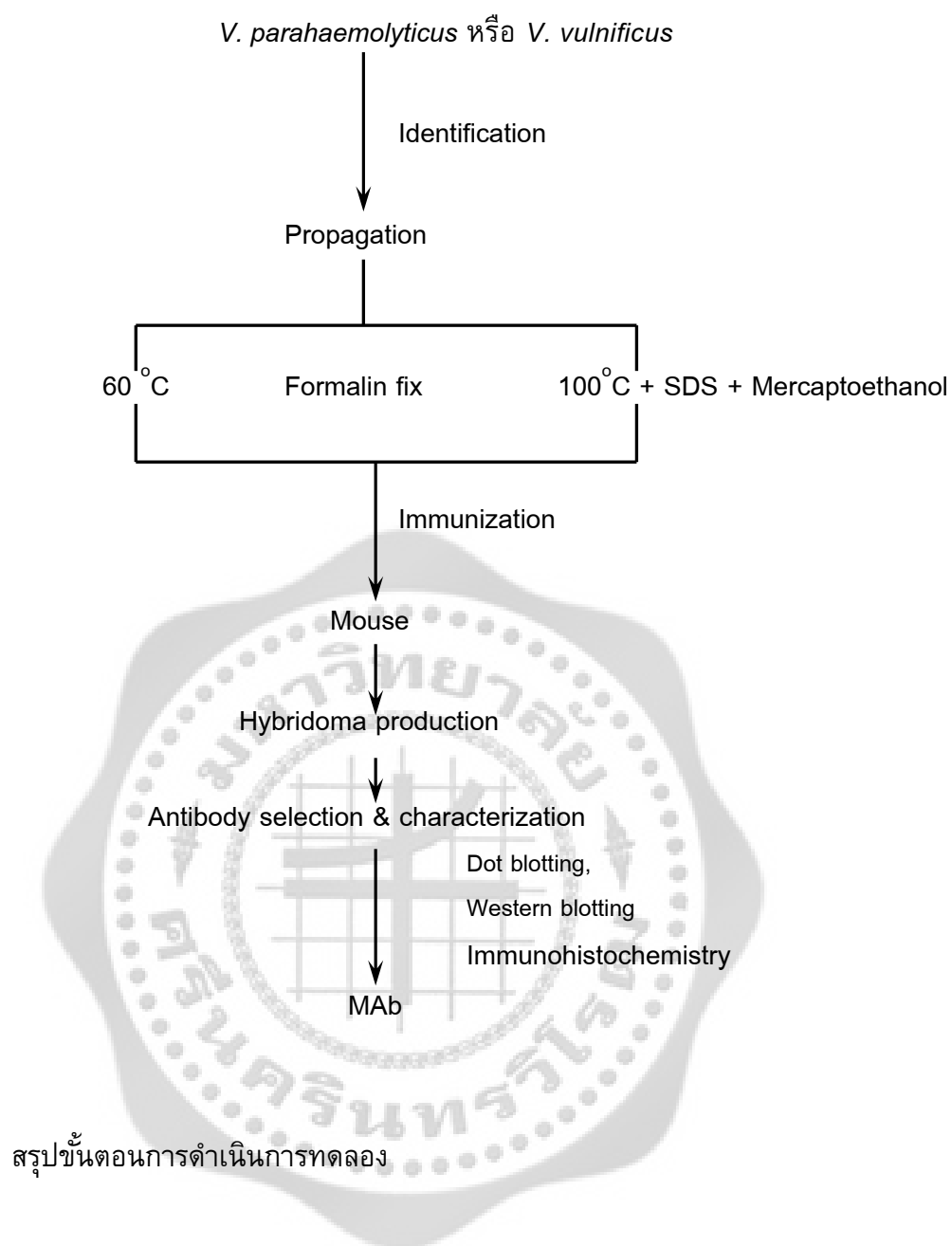
นำแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* หรือ *V. vulnificus* isolate ต่างๆ มาแยกใน SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 V เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บางส่วนของ gel นำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 บางส่วนนำมาถ่ายโปรตีนจาก gel ลงสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ transblot apparatus (Biorad) สำหรับกระบวนการ Western blotting ทำโดยนำ nitrocellulose membrane ที่ได้แยกบ่มใน MAb แต่ละชนิดและผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot-blotting เพื่อหาตำแหน่งและพิสูจน์ทราบแอนติเจนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

5.3 Immunohistochemistry

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือ *V. vulnificus* ความเข้มข้น 10^6 เซลล์/กรัมฉีดให้กุ้งขาวที่มีชีวิต จากนั้น 2-3 วันเลือกกุ้งที่แสดงอาการอ่อนเพลีย หยุดกินอาหาร มาตัดส่วนหัวแบ่งครึ่งแช่ใน Davidson's fixative จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นๆ หนา 8 μm ติดบนสไลด์ นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene จากนั้นผ่านลง butanol (100 %) 95 %-70 % ethanol และน้ำ บ่มใน MAb ชนิดต่างๆ ล้าง section ด้วย PBS บ่มใน GAM-HRP และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03 % DAB, 0.006 % H_2O_2 ละลายใน PBS ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin Y (H & E) ตี้งน้ำด้วย ethyl alcohol เปอร์เซนต์ต่างๆ และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็น slide ถาวรโดยใช้ permount บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาล

6. การตรวจ class และ subclass

ทำโดยใช้ sandwich ELISA Zymed's Mouse Mono AB ID kit



ตารางที่ 1 List of bacterial isolates and sources used in this study.

V. parahaemolyticus 28 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VP1 = <i>V. parahaemolyticus</i> 22091, O8:K21	DMST	Stool
2	VP2 = <i>V. parahaemolyticus</i> 22092, O2:K3	DMST	Food
3	VP3 = <i>V. parahaemolyticus</i> 22093, O2:K3	DMST	Food
4	VP4 = <i>V. parahaemolyticus</i> 22094, O4:K34	DMST	Stool
5	VP5 = <i>V. parahaemolyticus</i> 1 VPV O5:K33	VMARC	Aquatic animals
6	VP6 = <i>V. parahaemolyticus</i> 2 VPB O5:K33	DABU	<i>P. monodon</i>
7	VP7 = <i>V. parahaemolyticus</i> 5665 O10:KUT	DMSC	Stool
8	VP8 = <i>V. parahaemolyticus</i> 45034 O10:KUT	DABU	Stool
9	VP9 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23794 O3:K54	DMST	Stool
10	VP10 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23795 O10:KUT	DMST	Stool
11	VP11 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23796 O2:K28	DMST	Stool
12	VP12 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23797 O10:KUT	DMST	Stool
13	VP13 = <i>V. parahaemolyticus</i> 15285 OUT:KUT	DMST	Food
14	VP14 = <i>V. parahaemolyticus</i> 20245 O1:KUT	DMST	?
15	VP15 = <i>V. parahaemolyticus</i> 21243 O1:K1	DMST	?
16	VP16 = <i>V. parahaemolyticus</i> 21296 O4:K12	DMST	Food
17	VP17 = <i>V. parahaemolyticus</i> 21308 O1:K32	DMST	Seafood
18	VP18 = <i>V. parahaemolyticus</i> 21318 O2:K28	DMST	Food
19	VP19 = <i>V. parahaemolyticus</i> 21330 O3:KUT	DMST	Shrimp
20	VP20 = <i>V. parahaemolyticus</i> 21332 O11:KUT	DMST	Stool
21	VP21 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23798 O10:K52	DMST	Stool
22	VP22 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23801 O5:KUT	DMST	Stool
23	VP23 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23802 O4:KUT	DMST	Stool
24	VP24 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23803 O3:K54	DMST	Stool
25	VP25 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23804 O3:K7	DMST	Stool
26	VP26 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23805 O4:K68	DMST	Stool
27	VP27 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23806 O2:K28	DMST	Stool
28	VP28 = <i>V. parahaemolyticus</i> 23807 O10:KUT	DMST	Stool

Note:

CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University.

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd.

DABU = Department of Aquatic Science, Burapa University.

DMSC = Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

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

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

GB = Ghent University, Belgium

NCIMB = National Collection of Industrial Marine and Food Bacteria, UK.

SWU = Department of Biology, Srinakharinwirot University.

VMARC = Veterinary Medical Aquatic Research Center, Chulalongkorn University.

? = unknown

V. vulnificus 14 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VV1 = <i>V. vulnificus</i> (VVB)	DABU	Sea bass
2	VV2 = <i>V. vulnificus</i> MT1506	DABU	?
3	VV3 = <i>V. vulnificus</i> 4907006	SWU	<i>P. vannamei</i>
4	VV4 = <i>V. vulnificus</i> 4907001	SWU	<i>P. vannamei</i>
5	VV5 = <i>V. vulnificus</i> 4907011	SWU	<i>P. vannamei</i>
6	VV6 = <i>V. vulnificus</i> 27426	DMST	Hemoculture
7	VV7 = <i>V. vulnificus</i> 27427	DMST	Blood
8	VV8 = <i>V. vulnificus</i> 27428	DMST	Hemoculture
9	VV9 = <i>V. vulnificus</i> 27429	DMST	Hemoculture
10	VV10 = <i>V. vulnificus</i> 19346	DMST	?
11	VV11 = <i>V. vulnificus</i> 22441	DMST	?
12	VV12 = <i>V. vulnificus</i> 26351	DMST	?
13	VV13 = <i>V. vulnificus</i> 5852	DMST	?
14	VV? = <i>V. vulnificus</i> VVBs (<i>V. ponticus</i> ?)	DABU	Sea bass

Vibrio harveyi 30 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VH1 = <i>V. harveyi</i> 639	Centex	<i>P. monodon</i>
2	VH2 = <i>V. harveyi</i> 1526	Centex	<i>P. monodon</i>
3	VH3 = <i>V. harveyi</i> 114 (VHS1)	Centex	<i>P. monodon</i>
4	VH4 = <i>V. harveyi</i> 47666-1 UK	DABU	?
5	VH5 = <i>V. harveyi</i> MM30	GB	?
6	VH6 = <i>V. harveyi</i> MM77	GB	?
7	VH7 = <i>V. harveyi</i> 22888	GB	?
8	VH8 = <i>V. harveyi</i> 22889	GB	?
9	VH9 = <i>V. harveyi</i> LMG 22891	GB	?
10	VH10 = <i>V. harveyi</i> LMG 22893	GB	?
11	VH11 = <i>V. harveyi</i> LMG 22894	GB	?
12	VH12 = <i>V. harveyi</i> LMG 22895	GB	?
13	VH13 = <i>V. harveyi</i> GB 120	GB	?
14	VH14 = <i>V. harveyi</i> GB 152	GB	?
15	VH15 = <i>V. harveyi</i> GB170	GB	?
16	VH16 = <i>V. harveyi</i> GB 612	GB	?
17	VH17 = <i>V. harveyi</i> GB 886	GB	?
18	VH18 = <i>V. harveyi</i> 25919	Centex	?
19	VH19 = <i>V. harveyi</i> VG	Centex	?
20	VH20 = <i>V. harveyi</i> 14126	Centex	?
21	VH21 = <i>V. harveyi</i> 39804	Centex	?
22	VH22 = <i>V. harveyi</i> 1039i	Centex	?
23	VH23 = <i>V. harveyi</i> 1039II	Centex	?
24	VH24 = <i>V. harveyi</i> 1039III	Centex	?
25	VH25 = <i>V. harveyi</i> 2230	Centex	?
26	VH26 = <i>V. harveyi</i> Surat	DABU	?
27	VH27 = <i>V. harveyi</i> H1	CPF	Shrimp pond
28	VH28 = <i>V. harveyi</i> H3	CPF	Shrimp pond
29	VH29 = <i>V. harveyi</i> H4	CPF	Shrimp pond
30	VH30 = <i>V. harveyi</i> H5	CPF	Shrimp pond
	V? = <i>Vibrio sp.</i> H2	CPF	Shrimp pond

V. campbellii 3 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	Vca1 = <i>V. campbellii</i> LMG 21361	GB	?
2	Vca2 = <i>V. campbellii</i> LMG 21362	GB	?
3	Vca3 = <i>V. campbellii</i> LMG 21363	GB	?

V. mimicus 10 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VM1 = <i>V. mimicus</i> 15142	DMSC	Patient
2	VM2 = <i>V. mimicus</i> 22088	DMST	Food
3	VM3 = <i>V. mimicus</i> 22089	DMST	Food
4	VM4 = <i>V. mimicus</i> 22090	DMST	Food
5	VM5 = <i>V. mimicus</i> 24053	DMST	Food
6	VM6 = <i>V. mimicus</i> 24054	DMST	Water
7	VM7 = <i>V. mimicus</i> 24055	DMST	Water
8	VM8 = <i>V. mimicus</i> 24056	DMST	Food
9	VM9 = <i>V. mimicus</i> B1.4	SWU	<i>P. vannamei</i>
10	VM10 = <i>V. mimicus</i> 27430	DMST	Rectal swab

V. cholerae 25 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VC1 = <i>V. cholerae</i> 22115 O1, El Tor, Inaba	DMST	Stool
2	VC2 = <i>V. cholerae</i> 22116 O1, El Tor, Inaba	DMST	Stool
3	VC3 = <i>V. cholerae</i> 22117 O1, El Tor, Inaba	DMST	Stool
4	VC4 = <i>V. cholerae</i> 22118 O1, El Tor, Inaba	DMST	Stool
5	VC5 = <i>V. cholerae</i> 22125 O1, El Tor, Ogawa	DMST	Rectal swab
6	VC6 = <i>V. cholerae</i> 22126 O1, El Tor, Ogawa	DMST	Rectal swab
7	VC7 = <i>V. cholerae</i> 22127 O1, El Tor, Ogawa	DMST	Rectal swab
8	VC8 = <i>V. cholerae</i> 22128 O1, El Tor, Ogawa	DMST	Rectal swab
9	VC9 = <i>V. cholerae</i> 22135 O139	DMST	Stool
10	VC10 = <i>V. cholerae</i> 22136 O139	DMST	Stool
11	VC11 = <i>V. cholerae</i> 22137 O139	DMST	Stool
12	VC12 = <i>V. cholerae</i> 22138 O139	DMST	Stool
13	VC13 = <i>V. cholerae</i> 22413 O141	DMST	?
14	VC14 = <i>V. cholerae</i> 22140 non O1, O139, O141	DMST	Food
15	VC15 = <i>V. cholerae</i> 22141 non O1, O139, O141	DMST	Food
16	VC16 = <i>V. cholerae</i> 22142 non O1, O139, O141	DMST	Food
17	VC17 = <i>V. cholerae</i> 22143 non O1, O139, O141	DMST	Stool
18	VC18 = <i>V. cholerae</i> 22144 non O1, O139, O141	DMST	?
19	VC19 = <i>V. cholerae</i> B20 non O1, O139, O141	SWU	<i>P. vannamei</i>
20	VC20 = <i>V. cholerae</i> 4907014 non O1, O139, O141	SWU	<i>P. vannamei</i>
21	VC21 = <i>V. cholerae</i> 27424 non O1, O139, O141	DMST	Stool
22	VC22 = <i>V. cholerae</i> 27425 non O1, O139, O141	DMST	Stool
23	VC23 = <i>V. cholerae</i> 25087 non O1, O139, O141	DMST	?
24	VC24 = <i>V. cholerae</i> 520601	SWU	<i>P. vannamei</i>
25	VC25 = <i>V. cholerae</i> 520602	SWU	<i>P. vannamei</i>

V. alginolyticus 15 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VA1 = <i>V. alginolyticus</i> 22082	DMST	Stool
2	VA2 = <i>V. alginolyticus</i> 22083	DMST	Food
3	VA3 = <i>V. alginolyticus</i> 22084	DMST	Food
4	VA4 = <i>V. alginolyticus</i> Y16	SWU	Shrimp pond
5	VA5 = <i>V. alginolyticus</i> BY2	SWU	Shrimp pond
6	VA6 = <i>V. alginolyticus</i> BY17	SWU	Shrimp pond
7	VA7 = <i>V. alginolyticus</i> BY18	SWU	Shrimp pond
8	VA8 = <i>V. alginolyticus</i> Y2	SWU	Seawater
9	VA9 = <i>V. alginolyticus</i> Y3	SWU	Seawater
10	VA10 = <i>V. alginolyticus</i> Y4	SWU	Seawater
11	VA11 = <i>V. alginolyticus</i> 24045	DMST	Food
12	VA12 = <i>V. alginolyticus</i> 24046	DMST	Food
13	VA13 = <i>V. alginolyticus</i> 24047	DMST	Stool
14	VA14 = <i>V. alginolyticus</i> 24048	DMST	Water
15	VA15 = <i>V. alginolyticus</i> 14800	DMSC	Seafood

V. fluvialis 7 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VF1 = <i>V. fluvialis</i> 22085	DMST	Rectal swab
2	VF2 = <i>V. fluvialis</i> 22086	DMST	Stool
3	VF3 = <i>V. fluvialis</i> 22087	DMST	Stool
4	VF4 = <i>V. fluvialis</i> 24049	DMST	Stool
5	VF5 = <i>V. fluvialis</i> 24050	DMST	Stool
6	VF6 = <i>V. fluvialis</i> 24051	DMST	Stool
7	VF7 = <i>V. fluvialis</i> 24052	DMST	Stool

V. penaeicida 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	Vpen = <i>V. penaeicida</i>	DMSC	?

V. ordalii 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VO = <i>V. ordalii</i> VIB 02	DABU	?

V. anguillarum 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VAn = <i>V. anguillarum</i> AVL01	DMSC	?

V. shilonii 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	VS = <i>V. shilonii</i>	SWU	?

Aeromonas hydrophila 20 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	AH1 = <i>A. hydrophila</i> 1234	VMARC	Carp kidney
2	AH2 = <i>A. hydrophila</i> 24057	DMST	Stool
3	AH3 = <i>A. hydrophila</i> 2798	DMST	?
4	AH4 = <i>A. hydrophila</i> 22095	DMST	Blood
5	AH5 = <i>A. hydrophila</i> 22096	DMST	Stool
6	AH6 = <i>A. hydrophila</i> 22097	DMST	Stool
7	AH7 = <i>A. hydrophila</i> 22098	DMST	Stool
8	AH8 = <i>A. hydrophila</i> 490601	SWU	Goldfish intestine
9	AH9 = <i>A. hydrophila</i> 04082	AAHRI	?
10	AH10 = <i>A. hydrophila</i> 24058	DMST	Stool
11	AH11 = <i>A. hydrophila</i> 24059	DMST	Stool
12	AH12 = <i>A. hydrophila</i> 24060	DMST	Stool
13	AH13 = <i>A. hydrophila</i> 213	SWU	Gold fish
14	AH14 = <i>A. hydrophila</i> 221	SWU	Gold fish
15	AH15 = <i>A. hydrophila</i> FS2	SWU	Fairy shrimp
16	AH16 = <i>A. hydrophila</i> 251	SWU	Fairy shrimp
17	AH17 = <i>A. hydrophila</i> 4FS2	SWU	Fairy shrimp
18	AH18 = <i>A. hydrophila</i> 09021011/3s	AAHRI	?
19	AH19 = <i>A. hydrophila</i> 09021017/3k	AAHRI	?
20	AH20 = <i>A. hydrophila</i> 08021107	AAHRI	?

A. sobria 17 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	AS1 = <i>A. sobria</i> 12056	NCIMB	?
2	AS2 = <i>A. sobria</i> 12446	DMST	Stool
3	AS3 = <i>A. sobria</i> 22099	DMST	Stool
4	AS4 = <i>A. sobria</i> 22100	DMST	Stool
5	AS5 = <i>A. sobria</i> 22101	DMST	Stool
6	AS6 = <i>A. sobria</i> 22102	DMST	Stool
7	AS7 = <i>A. sobria</i> 24061	DMST	Stool
8	AS8 = <i>A. sobria</i> 24062	DMST	Stool
9	AS9 = <i>A. sobria</i> 24063	DMST	Stool
10	AS10 = <i>A. sobria</i> 24064	DMST	Stool
11	AS11 = <i>A. sobria</i> FS1	SWU	Fairy shrimp
12	AS12 = <i>A. sobria</i> 4FS1	SWU	Fairy shrimp
13	AS13 = <i>A. sobria</i> AFS4	SWU	Fairy shrimp
14	AS14 = <i>A. sobria</i> 0802111	AAHRI	?
15	AS15 = <i>A. sobria</i> 09021008/7K	AAHRI	?
16	AS16 = <i>A. sobria</i> 09021012/1	AAHRI	?
17	AS17 = <i>A. sobria</i> 09021014/1S	AAHRI	?

A. caviae 10 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	AC1 = <i>A. caviae</i> 13016	NCIMB	?
2	AC2 = <i>A. caviae</i> 22103	DMST	Stool
3	AC3 = <i>A. caviae</i> 22104	DMST	Rectal swab
4	AC4 = <i>A. caviae</i> 22105	DMST	Stool
5	AC5 = <i>A. caviae</i> 22106	DMST	Stool
6	AC6 = <i>A. caviae</i> 24065	DMST	Stool
7	AC7 = <i>A. caviae</i> 24066	DMST	Stool
8	AC8 = <i>A. caviae</i> 24067	DMST	Stool
9	AC9 = <i>A. caviae</i> 24068	DMST	Pus
10	AC10 = <i>A. caviae</i> 06103	AAHRI	?

A. veronii 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	AV = <i>A. veronii</i> 21255 ATCC35624	DMST	?

A. jandaei 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	AJ = <i>A. jandaei</i> 21256 ATCC49568	DMST	?

Plesiomonas shigelloides 3 isolates

No.	Bacteria	Institute	Source
1	PS1 = <i>P. shigelloides</i> 22107	DMST	rectal swab
2	PS2 = <i>P. shigelloides</i> 22108	DMST	rectal swab
3	PS3 = <i>P. shigelloides</i> 22109	DMST	rectal swab

แบคทีเรียแกรมลบอีก 10 ชนิดๆ ละ 1 isolate

No.	Bacteria	Institute	Source
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	DMSM	?
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CPF	?
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DMSM	?
4	<i>Morganella morganii</i>	DMSM	?
5	<i>Proteus vulgaris</i>	DMSM	?
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DMSM	?
7	<i>Salmonella</i> Enteritidis 7108	DMST	?
8	<i>Salmonella</i> Typhi	DMSM	?
9	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 1408	CPF	?
10	<i>Shigella flexneri</i>	DMSM	?



MAb ต่อ *V. parahaemolyticus*

จากการใช้ *V. parahaemolyticus* ปฏิกิริยามีคุ้มกันในหนูขาวแล้วนำไปผลิต MAb สามารถคัดเลือก MAb ได้ทั้งหมด 15 โคลนที่มีความจำเพาะต่างๆ กันสามารถแบ่งเป็น 11 กลุ่มตามความจำเพาะได้ดังนี้ (ตารางที่ 2, รูปที่ 1)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 14 isolates และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *V. alginolyticus* ได้ 5 isolates โดย MAb ไม่จับกับแอนติเจนที่ตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting และ IHC

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย MAb 3 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 5 isolates เท่านั้น โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ MAb ที่ได้จับกับแอนติเจนเป็นแถบกว้างขนาด 30-67 kDa สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื่อในเนื้อเยื่อโดยวิธี IHC ได้

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 6 isolates และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับ *V. alginolyticus* ได้ 3 isolates โดย MAb ไม่จับกับแอนติเจนที่ตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting และ IHC

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 11 isolates เท่านั้น แอนติบอดีไม่จับกับแอนติเจนเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting แต่สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื่อในเนื้อเยื่อโดยวิธี IHC ได้

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย MAb 2 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 4 isolates และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. harveyi* 1 isolate (VH28) แอนติบอดีสามารถจับกับแอนติเจนขนาด 6 kDa และใช้ตรวจสอบการติดเชื่อโดยวิธี IHC ได้

กลุ่มที่ 6-9 ประกอบด้วย MAb กลุ่ม 1 โคลน สามารถทำปฏิกิริยากับ *V. parahaemolyticus* เพียง 1 isolate เท่านั้น โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

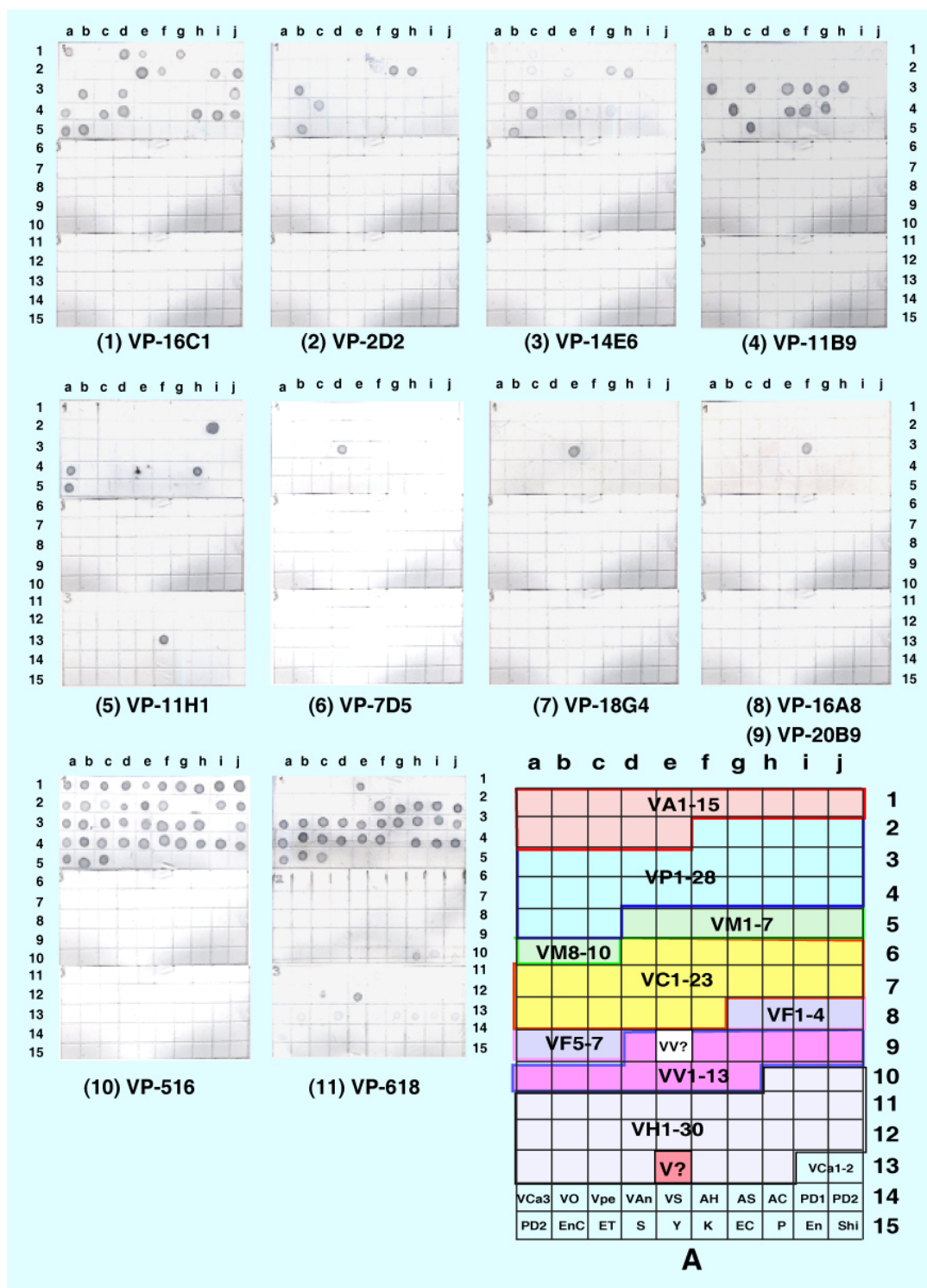
กลุ่มที่ 10 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* เกือบทุก isolate ที่ทดสอบ (ยกเว้น VP 2, 3 และ 14) และสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *V. alginolyticus* ได้ทั้งหมด (15 isolates) แต่แอนติบอดีไม่สามารถจับกับแอนติเจนโดยวิธี Western blotting และ IHC ได้

กลุ่มที่ 11 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* ทุก isolate ที่ทดสอบ (ยกเว้น VP22) และมีทำปฏิกิริยาข้ามกับ VA และ VH อย่างละ 1 isolate แอนติบอดีจับกับแอนติเจนขนาด 31 kDa แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื่อโดยวิธี IHC ได้

MAb ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgM ยกเว้นในกลุ่มที่ 1, 3, 4 และ 9-11 เป็น IgG และมีความไวในการตรวจจับแอนติเจนส่วนใหญ่เท่ากับ 10^7 - 10^8 CFU/ml

ตารางที่ 2 Specificity of monoclonal antibodies against *V. parahaemolyticus*. The binding of antibodies to various bacteria was determined by dot blotting using bacteria at approximately 10^9 CFU ml⁻¹. +++ = very intense staining, - = not staining. IHC = immunohistochemistry, VP = *V. parahaemolyticus*, VA = *V. alginolyticus*. The number of each isolate was assigned as appeared in Table 1

Group	MAb (isotype)	Antigen Western blotting (kDa)	IHC	Sensitivity Dot Blotting (CFU ml ⁻¹)	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
1	VP-16C1 (G2a)	-	-	10^8	VP1, 4, 5, 7, 9, 15, 16, 18, 19, 23-27 VA1, 4-5, 7, 15
2	VP-2D2, 7F6, 12H4 (M)	30-67	+++	10^8	VP2, 3, 7, 18, 27
3	VP-14E6 (G2a)	-	-	10^8	VP2, 3, 7, 18, 20, 27 (+++) VA 3, 13, 15 (+)
4	VP-11B9 (G2b)	-	++	10^7	VP6, 8, 10-13, 17, 20-22, 28,
5	VP-11H1 (M) 20B6 (M)	6	+++	10^7 10^8	VP4, 6, 13, 16, VH28
6	VP-7D5 (M)	-	+++	10^7	VP9
7	VP-18G4 (M)	23-76	+++	10^7	VP10
8	VP-16A8 (M)	-	-	10^8	VP11
9	VP-20B9 (G)	7, 38-48	+++	10^7	VP11
10	VP-516 (G2a)	-	-	10^7	VP almost isolates except VP 2, 3, 14 VA all isolates
11	VP-618 (G2b)	31	-	10^7	VP almost isolates except VP22 VA5, VH18, slightly cross with another VH



รูปที่ 1 Cross-reactivity of MAbs against *V. parahaemolyticus* assayed by dot blotting. Heated killed bacteria (10^9 CFU/ml) were spot on nitrocellulose membrane (1 μ l/spot) and treated with various MAbs: (1) VP-16C1, (2) VP-2D2, (3) VP-14E6, (4) VP-11B9, (5) VP-11H1, (6) VP-7D5, (7) VP-18G4, (8) VP-16A8 or (9) VP-20B9, (10) VPA-516 and (11) VP-618. A = diagram of the spotted bacteria. VA = *V. alginolyticus*, VP = *V. parahaemolyticus*, VM = *V. mimicus*, VC = *V. cholerae*, VF = *V. fluvialis*, VV = *V. vulnificus*, VH = *V. harveyi*, V? = *Vibrio* sp., Vca = *V. campbellii*, VO = *V. ordalii*, Vpe = *V. penaeicida*, VAn = *V. anguillarum*, VS = *V. shilonii*, AH = *Aeromonas hydrophila*, AS = *A. sobria*, AC = *A. caviae*, PD = *Photobacterium damsela*, EnC = *Enterococcus*, ET = *Ent. tarda*, S = *Salmonella*, Y = *Yersinia*, K = *Klebsella*, EC = *Escherichia coli*, P = *Pseudomonas*, En = *Enterobacter*, Shi = *Shigella*

จากการผลิต MAb จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* ได้ 11 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 6-9 มีความจำเพาะแคบสามารถจับกับ *V. parahaemolyticus* เพียงบาง isolate เท่านั้นเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาบทบาทในการก่อโรคเพราะมีความจำเพาะสูงและสามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อได้ MAb กลุ่มที่ 2 และ 5 มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* 4-5 isolates และจับ *V. harveyi* 1 isolate (กลุ่มที่ 5) แต่แอนติบอดีทั้ง 2 กลุ่มเป็นชนิด IgM และมีความไวต่ำประมาณ 10^7 CFU/ml จึงไม่น่าจะใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ strip test ส่วน MAb กลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะกว้างและมีความไวมากกว่า MAb กลุ่มที่ 1 และ 3 สำหรับ MAb กลุ่มที่ 10 และ 11 มีความจำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* เกือบทั้งหมด โดยเฉพาะกลุ่มที่ 10 สามารถจับ *V. alginolyticus* ได้ทุก isolate จึงน่าจะใช้ MAb ทั้ง 2 กลุ่มนี้ร่วมกับ MAb กลุ่มที่ 4 ในการพัฒนาชุดตรวจ strip test จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* และ *V. alginolyticus* ได้ (ตารางที่ 3) แต่เนื่องจากความไวของ MAb ทั้ง 3 กลุ่ม (กลุ่ม 4, 10 และ 11) ไม่สูงมากนัก (10^7 CFU/ml) ดังนั้นถ้านำ MAb ที่มีความไวไม่สูงนี้มาใช้รวมกันความไวในการตรวจจะลดลงอีกมากจึงจำเป็นต้องผลิต MAb ที่มีความไวสูงขึ้นและหาคู่ที่เหมาะสมหรือผลิต polyclonal antibodies (PAb) สำหรับการพัฒนาชุดตรวจ strip test ต่อไป



ตารางที่ 3 สรุปความจำเพาะของ MAb against *V. parahaemolyticus* ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็น strip test ได้ *** From different sources

MAbs		VP-11B9	VP-516	VP-618
Sensitivity		10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
Bacteria	Source			
<i>V. parahaemolyticus</i>				
VP1 (22091)	DMST		+++	+++
VP2 (22092)	DMST			+++
VP3 (22093)	DMST			+++
VP4 (22094)	DMST		+++	+++
VP5 (1 VPV)	VMARC		+++	+++
VP6 (2 VPB)	DABU	+++	+++	+++
VP7 (5665)	DMSC		+++	+++
VP8 (45034)	DABU	+++	+++	+++
VP9 (23794)	DMST		+++	+++
VP10 (23795)	DMST	+++	+++	+++
VP11 (23796)	DMST	+++	+++	+++
VP12 (23797)	DMST	+++	+++	+++
VP13 (15285)	DMST	+++	+++	+++
VP14 (20245)	DMST			+++
VP15 (21243)	DMST		+++	+++
VP16 (21296)	DMST		+++	+++
VP17 (21308)	DMST	+++	+++	+++
VP18 (21318)	DMST		+++	+++
VP19 (21330)	DMST		+++	+++
VP20 (21332)	DMST	+++	+++	+++
VP21 (23798)	DMST	+++	+++	+++
VP22 (23801)	DMST	+++	+++	
VP23 (23802)	DMST		+++	+++
VP24 (23803)	DMST		+++	+++
VP25 (23804)	DMST		+++	+++
VP26 (23805)	DMST		+++	+++
VP27 (23806)	DMST		+++	+++
VP28 (23807)	DMST	+++	+++	+++
<i>V. alginolyticus</i>				
VA1 (22082)	DMST		+++	
VA2 (22083)	DMST		+++	
VA3 (2084)	DMST		+++	
VA4 (Y16)	SWU		+++	
VA5 (BY2)	SWU		+++	++
VA6 (BY17)	SWU		+++	
VA7 (BY18)	SWU		+++	
VA8 (Y2)	SWU		+++	
VA9 (Y3)	SWU		+++	
VA10 (Y4)	SWU		+++	
VA11 (24045)	DMST		+++	
VA12 (24046)	DMST		+++	
VA13 (24047)	DMST		+++	
VA14 (24048)	DMST		+++	
VA15 (14800)	DMSC		+++	
VH18 (25919)	CENTEX			++
VV (1-13)	***	-	-	-
VH (1-17, 19-30)	***	-	-	-
Vca	***	-	-	-
VM (1-10)	***	-	-	-
VC (1-25)	***	-	-	-
VF (1-7)	***	-	-	-

MAB ต่อ *V. vulnificus*

จากการรวบรวม *V. vulnificus* และนำมาฉีดหนูขาวสามารถผลิต MAb ได้แยกเป็น 6 กลุ่มตามคุณสมบัติและความจำเพาะดังนี้ (ตารางที่ 3, รูปที่ 2)

กลุ่มที่ 1-4 ประกอบด้วย MAb ที่มีความสามารถจับกับ *V. vulnificus* ได้เพียง 1-2 isolate เท่านั้นและไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดย MAb กลุ่มที่ 2 สามารถจับกับแอนติเจนที่ตรวจสอบด้วยวิธี Western blotting และ IHC ได้

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย MAb 1 โคลนมีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* 5 isolates โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ MAb ที่ได้จับกับแอนติเจนขนาด 3-14 kDa และสามารถใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อด้วยวิธี IHC ได้

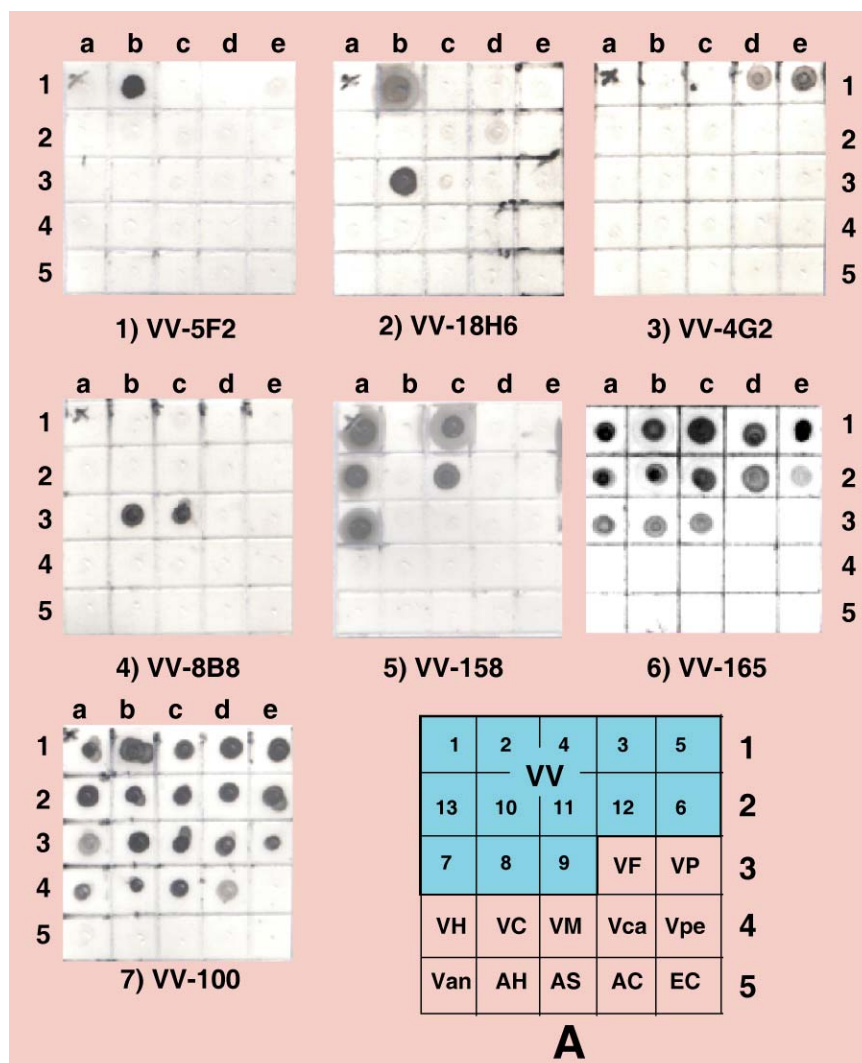
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* ทุก isolates ที่ทดสอบ แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ แอนติบอดีจับกับแอนติเจนขนาด 10, 18 kDa และสามารถตรวจสอบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อด้วยวิธี IHC ได้

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย MAb 1 โคลน มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* ทุก isolates ที่ทดสอบและสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ *Vibrio* ชนิดอื่นๆ ได้ยกเว้น *V. penaeicida* และ *V. anguillarum* แอนติบอดีจับกับแอนติเจนขนาด 5 kDa แต่ไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี IHC ได้

MAb ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG และมีความไวในการตรวจจับแอนติเจนประมาณ 10^5 - 10^7 CFU/ml

ตารางที่ 4 Specificity of monoclonal antibodies against *V. vulnificus*. The binding of antibodies to various bacteria was determined by dot blotting using bacteria at approximately 10^8 CFU ml⁻¹. +++ = very intense staining, - = not staining. IHC = immunohistochemistry, VV = *V. vulnificus*, Vpe = *V. penaeicida*, Van = *V. anguillarum*, VA = *V. alginolyticus*. The number of each isolate was assigned as appeared in Table 1

Group	MAb (isotype)	Antigen Western blotting (kDa)	IHC	Sensitivity Dot Blotting (CFU ml ⁻¹)	Bacterial immunoreactivity (Dot blotting)
1	VV-5F2 (G2b)	-	-	$\sim 10^7$	VV2
2	VV-18H6 (M)	8-13	+	$\sim 10^7$	VV2, 8
3	VV-4G2 (G2b) VV-19G12 (M)	-	-	$\sim 10^7$	VV3, 5
4	VV-8B8 (G2a)	-	-	$\sim 10^6$	VV8, 9
5	VV-158 (G2b)	3-14	+	$\sim 10^5$	VV1, 4, 7,11,13
6	VV-165 (G2a)	10, 18	+++	$\sim 10^7$	VV all, VA all
7	VV-100 (G2a)	5	-	$\sim 10^7$	VV all, Vibrio spp. Except VPe, Van



รูปที่ 2 Cross-reactivity of MAbs against *V. vulnificus* assayed by dot blotting. Heated killed bacteria (10^8 CFU/ml) were spot on nitrocellulose membrane (1 μ l/spot) and treated with various MAbs: (1) VV-5F2, (2) VV-18H6, (3) VV-4G2, (4) VV-8B8, (5) VV-158 (6) VV-165 and (7) VV-100. A = Diagram of the spotted bacteria. VV = *V. vulnificus*, VF = *V. fluvialis*, VP = *V. parahaemolyticus*, VH = *V. harveyi*, VC = *V. cholerae*, VM = *V. mimicus*, Vca = *V. campbellii*, Vpe = *V. penaeicida*, VAn = *V. anguillarum*, AH = *A. hydrophila*, AS = *A. sobria*, AC = *A. caviae*, EC = *E. coli*

จากการผลิต MAb จำเพาะต่อ *V. vulnificus* ได้ 8 โคลน ซึ่ง MAb ส่วนใหญ่มีความจำเพาะสูงมากโดยสามารถจับ *V. vulnificus* ได้เพียง 1-2 isolate (กลุ่มที่ 1-4, ตารางที่ 4) มีเพียงบางกลุ่มที่มีความจำเพาะกว้าง น่าจะนำมาใช้สำหรับพัฒนาชุดตรวจ strip test (ตารางที่ 5) ได้ดังนี้

- 1) MAb กลุ่มที่ 5 สามารถจับ *V. vulnificus* เท่านั้น จำนวน 5/13 isolate
- 2) MAb กลุ่มที่ 6 สามารถจับ *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* ทั้งหมด
- 3) MAb กลุ่มที่ 7 สามารถจับ *V. vulnificus* และ *Vibrio* spp. อื่นๆ ได้ ยกเว้น *V. penaeicida* และ *V. anguillarum*

ดังนั้นการใช้ MAb กลุ่มที่ 5 และ 6 ในการพัฒนา strip test ในส่วนของ colloidal gold และ test line โดยใช้ร่วมกับ MAb VP-516 ซึ่งจำเพาะต่อ *V. alginolyticus* ทุก isolate และ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ (ตารางที่ 2) น่าจะสามารถได้ชุดตรวจที่มีความจำเพาะต่อ *V. vulnificus* + *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ได้ ส่วน MAb กลุ่มที่ 7 สามารถใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสำหรับ *Vibrio* ทั่วไปได้ แต่เนื่องจาก MAb ทั้ง 3 กลุ่มมีความไวในการตรวจจับของ MAb ส่วนใหญ่ยังไม่สูงมากนัก $\sim 10^5$ - 10^7 CFU/ml โดยเฉพาะอย่างยิ่ง MAb ในกลุ่มที่ 6 ซึ่งสามารถจับ *V. vulnificus* และ *V. alginolyticus* และกลุ่มที่ 7 จับกับ *Vibrio* spp. มีความไวค่อนข้างต่ำ $\sim 10^7$ CFU/ml ดังนั้นการตรวจ *V. vulnificus* หรือ *V. alginolyticus* หรือ *Vibrio* spp. อาจจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียก่อนแล้วจึงตรวจด้วยชุดตรวจต่อไป

ตารางที่ 5 สรุปความจำเพาะของ MAb against *V. vulnificus* ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็น strip test ได้

MAbs		VV-158	VV-165	VV-100
Sensitivity		10^5	10^7	10^7
Bacteria	Source			
<i>V. vulnificus</i>				
VV1 (VVB)	DABU	+++	+++	+++
VV2 (MT1506)	DABU		+++	+++
VV3 (4907006)	SWU		+++	+++
VV4 (4907001)	SWU	+++	+++	+++
VV5 (4907011)	SWU		+++	+++
VV6 (27426)	DMST		+++	+++
VV7 (27427)	DMST	+++	+++	+++
VV8 (27428)	DMST		+++	+++
VV9 (27429)	DMST		+++	+++
VV10(19346)	DMST		+++	+++
VV11 (22441)	DMST	+++	+++	+++
VV12 (26351)	DMST		+++	+++
VV13 (5852)	DMST	+++	+++	+++
<i>V. alginolyticus</i>				
VA1 (22082)	DMST		+++	+++
VA2(22083)	DMST		+++	+++
VA3 (22084)	DMST		+++	+++
VA4 (Y16)	SWU		+++	+++
VA5(BY2)	SWU		+++	+++
VA6 (BY17)	SWU		+++	+++
VA7 (BY18)	SWU		+++	+++
VA8 (Y2)	SWU		+++	+++
VA9 (Y3)	SWU		+++	+++
VA10 (Y4)	SWU		+++	+++
VA11 (24045)	DMST		+++	+++
VA12 (24046)	DMST		+++	+++
VA13 (24047)	DMST		+++	+++
VA14 (24048)	DMST		+++	+++
VA15 (14800)	DMSC		+++	+++
<i>V. para</i> (13)	***			+++
<i>V. mimicus</i> (10)	***			+++
<i>V. cholerae</i> (25)	***			+++
<i>V. harveyi</i> (1)	***			+++
<i>V. campbellii</i> (3)	GB			+++
<i>V. fluvialis</i> (7)	***			+++
<i>V. ordalii</i> (1)	DABU			+++
<i>V. anguillarum</i> (1)	DMST			-
<i>V. penaeicida</i> (1)	DMSC			-
<i>V. shilonii</i> (1)	SWU			+++

สรุปและอภิปรายผล



สามารถผลิต MAb ที่จำเพาะต่อ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ได้แก่ VP-618 และ VP-11B9 ซึ่ง MAb ทั้ง 2 นี้เมื่อรวมกันสามารถจับกับ *V. parahaemolyticus* ได้ทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม MAb VP-618 แสดงปฏิกิริยาข้ามอ่อนๆ กับ *V. alginolyticus* 1 isolate (VA5) และ *V. harveyi* 2 isolate ได้แก่ VH1 และ VH 18 ดังนั้นคาดว่าเมื่อนำ MAb ทั้ง 2 โคลนนี้มารวมกันน่าจะนำมาพัฒนาเป็น strip test สำหรับตรวจ *V. parahaemolyticus* ได้

สำหรับ MAb จำเพาะต่อ *V. vulnificus* ได้เพียง MAB VV-158 ซึ่งจับกับ *V. vulnificus* 5 ใน 13 isolate ซึ่งเป็นสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงทั้งในสัตว์น้ำและมนุษย์ ส่วน MAb VV-165 สามารถจับ *V. vulnificus* ได้ทุก isolate และ *V. alginolyticus* ได้ทุก isolate นั้นถ้านำมารวมกับ MAb VP-516 ซึ่งจับกับ *V. alginolyticus* ได้ทุก isolate และ *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ และ MAb-618 น่าจะนำมาใช้ทดสอบ *Vibrio* ทั้ง 3 สายพันธุ์รวมกันได้เนื่องจาก *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* เป็น *Vibrio* ที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำและปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารอันเป็นสาเหตุหลักในการก่อโรคท้องร่วง

นอกจากนี้ในกรณีของ MAb VV-100 ซึ่งจับกับ *Vibrio* ทั่วไปเกือบทุก isolates น่าจะมีประโยชน์ในการพัฒนาชุดตรวจสำหรับ *Vibrio* ทั่วไปด้วย คาดว่าจะสามารถใช้ MAb เหล่านี้พัฒนาเป็นชุดตรวจได้ 3 ชุดคือ

1. ชุดตรวจ *V. parahaemolyticus*
2. ชุดตรวจ *V. vulnificus* + *V. alginolyticus*
3. ชุดตรวจ *Vibrio* spp.

ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการผลิต PAb และ MAb เพิ่มเติมเพื่อให้ชุดตรวจมีความไวในการตรวจสูงสุดต่อไป



บรรณานุกรม

- Amaro C., Biosca E.G., Esteve C., Fouz B. and Torsnzo A.E. (1992). Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities Dis. Aquat. Org 13:29-35.
- Amaro C. and Biosca E.G. (1996). *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also opportunistic pathogen for humans. Appl. Environ. Microbiol. 62:1454-1457.
- Alcaide E., Gil-Zanz C., Sanjuan E., Esteve D., Amaro C. and Silveira L. (2001). *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. J. Fish Dis. 24:311-313.
- Alvarez J.D., Austin B., Alvarez A.M. and Reyes H. (1998). *Vibrio harveyi* : a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela. J. Fish Dis. 21 : 313-316.
- Baffone W., Vittoria E., Camana R., Citterio B., Casaroli A. and Pierfelici L. (2005). Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. in *in vitro* and *in vivo* systems. Food control 16:451-475.
- Bender J. and Romig D. (2004). *Vibrio vulnificus* septicemia from raw shellfish. A.J.I.C. 32:E62-63.
- Biosca E.G., Oliver J.D. and Amaro C. (1996). Phenotypic characterization of *Vibrio vulnificus* biotype 2, a lipopolysaccharide-based homogeneous O serogroup within *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 62:918-927.
- Biosca E.G., Marco-Noales E., Amaro C. and Alcaide E. (1997a). An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Vibrio vulnificus* biotype2: Development and field studies. Appl. Environ. Microbiol. 63:537-542.
- Biosca E.G., Amaro C., Larsen J.L. and Pedersen K. (1997b). Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio vulnificus*: proposal for the substitution of the subspecific Taxon biotype for Serovar. Appl. Environ. Microbiol. 63:1460-1466.
- Cerda'Cue'lla M., Jofre J. and Blanch A.R. (2000). A selective medium and specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 66:855-859.
- Chan K.Y., Woo M.L., Lam L.Y. and French G.H. (1989). *Vibrio haemolyticus* and other halophilic *Vibrio* associated with seafood in Hong Kong. J. Appl. Bacteriol. 66::57-64.
- Charni N., Perissl C., Le Petit J. and Rugan N. (2000). Production and characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. Applied Environ. Microbiol. 66:2278-2281.
- Esteve-Gassent M.D., Neilsen M.E. and Amaro C. (2003). The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*: development of a new method for antibody quantification in skin mucus. Fish and shellfish Immunology. 15:51-61.

- Faude U.C. and 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.
- Gopal S., Otta S.K., Kumar S., Karunasagar I., Nishibuchi M. and Karunasagar I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implication for food safety. *Internatl. J. Food Microbiol.* 102:151-159.
- Honda T., Miwatani T., Yabushita Y., Koike N. and Okada K. (1995). A novel method to chemically immobilized antibody on nylon and its application to the rapid and differentiation detection of two *Vibrio parahaemolyticus* toxins in a modified enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diagn. Lab. Immunol.* 2:177-181.
- He Y., Keen J.E., Westerman R.B., Littledike E.T. and Kwang J. (1996). Monoclonal antibodies for detection of the H7 antigen of *Escherichia coli*. *Applied Environ. Microbiol.* 62 :3325-3332.
- Jiravanichpaisal P., Miyazaki T. and Limsuwan C. (1994). Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Aquat. Animal Health.* 6:27-35.
- Kaufman G.E., Myers M.L., Pass C.L., Bej A.K. and Kaysner C.A. (2002). Molecular analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during US Pacific north-west outbreaks. *Letteres in Applied Microbiol.* 34:155-161.
- Kim Y.B., Okuda J., Matsumoto C., Takahashi N., Hashimoto S. and Nishibuchi M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clinical Microbiol.* 1173-1177.
- Köhler G. and Milstein C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee K.K., Liu P.C. and Huang C.Y. (2003). *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes and Infection.* 5:481-485.
- Linkous D.A. and Oliver J.D. (1999). Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters.* 174: 207-214.
- Liu P.C., Lee K.K., Yü K.C. Lou G.H. and Chen S.N. (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased Kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiol.* 33:129-132.

- Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Suksawad P., Srisuk C., Sithigorngul W., Piyatiratitivorakul S. and Sithigorngul P. (2008). Identification of *Vibrio* spp. in vibriosis *Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. J. Invert. Patho. 98 (1) : 63-68.
- Lui P.C., Chen Y.C. and Lee K.K. (2001). Pathenogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. Microbios. 104:71-77.
- Lui P.C., Chen Y.C., Huang C.Y. and Lee K.K. (2000). Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. Letteres in Applied Microbiol. 31 : 433-437.
- McCarter L.L. (2001). Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. Microbiol. Mol. Rev. 65:445-462.
- Martin S.J. and Siebeling R.J. (1991). Identification of *Vibrio vulnificus* o serovars with anti lipopoly-saccharide monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 29:1684-1688.
- Midturi J., Baker D., Winn R. and Fader R. (2005). Tubo-ovarian abscess caused by *Vibrio vulnificus*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 51:131-133.
- Mosman T.R., Bauman R. and Williamson A. R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I: Functional analysis by cell fusion. Eur. J. Immunol. 9:511-516.
- Osawa R., Arakawa E. and Watanabe H. (2002). Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. J. Clin. Microbiol. 40:2708-2709.
- Petel V.J., Gardner E. and Burton C.S. (2002). *Vibrio vulnificus* septicemia and leg ulcer. J. Am. Acad. Dermatol. 46: s144-s145.
- Phianphak W., Rengpipat S., Rukpratanporn S., Longyant S., Chaivisuthangkura P., Sithigorngul W. and Sithigorngul P. (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Org. 63:161-168.
- Pizzutto, M. and Hirst R.G. (1995). Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to *Penaeus monodon* larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. Dis. Aquat. Org. 21:61-68.
- Quinlan J.J. and Foegeding P.M. (1997). Monoclonal antibodies for use indetection of *Bacillus* and *Clostridium* spores. Applied Envirol. Microbiol. 63 : 482-487.
- Ripabelli G., Sammarco M.L., Grasso G.M., Fanelli I., Caprioli A. and Luzzi I. (1999). Occurence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic sea, Italy. Internatl. J. Food Microbiol. 49:43-48.

- Rivera-Betancourt M. and Keen J.E. (2000). Murine monoclonal antibodies specific for lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O26 and O111. *Applied Environ. Microbiol.* 66: 4124-4127.
- Saha P.K. and Nair G.B. (1997). Production of monoclonal antibodies to the non-membrane damaging cytotoxin (NMDCY) purified from *Vibrio cholerae* O26 and distribution of NMDCY among strains of *Vibrio cholerae* and other enteric bacteria determined by monoclonal-polyclonal sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection Immunol.* 65:801-805.
- Sithigorngul W., Rukpratanporn S., Pecharaburanin N., Longyant S., Chaivisuthangkura P. and Sithigorngul P. (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., Rukpratanporn S., Pecharaburanin N., Suksawat P., Longyant S., Chaivisuthangkura P. and Sithigorngul W. (2007a). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi*. *J. Microbiol. Methods.* 71: 256-264.
- Sithigorngul W., Rukpratanporn S., Sittidilokratna N., Pecharaburanin N., Longyant S., Chaivisuthangkura P. and Sithigorngul P. (2007b). A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow-head virus (YHV) infection in shrimp. *J. Virol. Methods.* 140 :193-199.
- Summer J. and Ross T. (2002). A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Intern. J. Food Microbiol.*, 77:55-59.
- Sung H.H., Hsu S.F., Chen C.K., Ting Y.Y. and Chao W.L. (2001). Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture.* 192: 101-110.
- Sung H.H. and Song Y.L. (1996). Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture.* 145: 41-45.
- Takeda T., Nair G.B., Suzuki K. and Shimonishi Y. (1990). Production of monoclonal antibody to *Vibrio cholerae* non-O1 heat-stable toxin (ST) which is cross-reactive with *Yersinia enterocolitica* ST. *Infection and Immunol.* 58: 2755-2759.
- Tsukamoto K.K., Yao K., Kamiya A., Yoshizawa S., Uchiyama N., Kogure K. and Wada M. (2006). Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 256 : 298-303.

- Vuddhakul V., Chowdhury A., Laohaprertthisan, Pungrasamee P., Patararungrong N., Thianmontri P., Ishibashi M., Matsumoto C. and Nishibushi M. (2000). Isolation of a pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied Environ. Microbiol.* 66: 2685-2689.
- Yam W.C., Chan C.Y., Bella W.H., Tam T.Y., Kueh C and Lee T. (1999). Abundance of clinical enteric bacterial pathogens in coastal waters and shellfish. *Water Res.* 34:51-56.
- Zhang X.H. and Austin B. (2005). A review haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1011-1019.

