การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการจำแนก *Vibrio harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรง จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Application of Monoclonal Antibody for Identification of Virulent *Vibrio harveyi* in Aquaculture

สุกานดา ทับเมฆา[1]*, ปภาศิริ กาญจโนภาศ-บาร์เนท[1] และ ไพศาล สิทธิกรกุล[2]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Sukanda Tubmeca[1]*, Praparsiri Kanchanopas-Barnette[1] and Paisarn Sithigorngul[2]

Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakrarinwirot University

บทคัดย่อ

จากการรวบรวม *Vibrio harveyi* จากแหล่งต่างๆ 8 สายพันธุ์ *Vibrio* spp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่ทราบชนิด *Vibrio* spp. เก็บจากอวัยวะของสัตว์น้ำ เช่น ตับกุ้ง ทางเดินอาหารของหอย เพรียงทราย และอาร์ทีเมีย ที่เจริญบนอาหาร TCBS และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ มาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E ซึ่งจำเพาะต่อ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง (*V. harveyi* 1526) โดยวิธี Dot Blotting และ Western Blotting พบว่าแบคทีเรียอื่นๆ *Vibrio* spp. ทุกชนิดและ *V. harveyi* 6 สายพันธุ์ให้ผลลบ มีเพียงสายพันธุ์เดียวจากสุราษฎร์ธานีที่แยกจากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคเท่านั้น ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ได้เช่นเดียวกับ *V. harveyi* 1526 ซึ่งจากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีพบว่า *V. harveyi* ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะคล้ายกัน แต่บางลักษณะแตกต่างจาก *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นที่ร่วมทดสอบ แสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E ทำปฏิกิริยากับ *V. harveyi* ชนิดก่อโรครุนแรงและมี cross reactivity กับ *V. harveyi* จากสุราษฎร์ธานี ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถจำแนก *V. harveyi* ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำได้ และคาดว่าจะนำมาใช้ตรวจสอบเพื่อควบคุมการระบาดของโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : แบคทีเรียเรืองแสง โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Abstract

Eight strains of *Vibrio harveyi*, *Vibrio* spp. from different sources, *Vibrio* spp. grown on TCBS agar and isolated from shrimp hepatopancreas, digestive system of mollusks, polycheate and brine shrimp and non-Vibrio species, were tested with monoclonal antibody (MAb). MAb VH26-11E specific to virulent strain of *V. harveyi* by dot blotting and Western blotting were used for *Vibrio* spp. studying. and six species of *V. harveyi* were negative, except that only the type of *V. harveyi* being isolated from *P. monodon* at Surattani province reacted with the MAb as same as *V. harveyi* 1526. The result of biochemical technique test for confirmation revealed that both species of *V. harveyi* were similar, but some kinds of their characteristics were different from the others being tested. This indicates that VH26-11E can act with virulent *V. harveyi* and generate cross reactivity with *V. harveyi* of Surattani sample. Hence, MAb can be used to differentiate virulent *V. harveyi* from non-virulent isolates. Besides, it is expected to monitor the outbreak of bacterial infection in aquaculture system.

Keywords : *Vibrio harveyi*, monoclonal antibody

***Corresponding author.** E-mail : adnakus@hotmail.com, adnakus@yahoo.com

บทนำ

โรคแบคทีเรียเรืองแสงเกิดจากเชื้อ *V. harveyi* เป็นโรคที่ก่อปัญหากับธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะในโรงเพาะฟักกุ้งทะเล (ลิลา เรืองแป้น และคณะ, 2540) โดยแบคทีเรียเรืองแสงสามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย (ชัยวุฒิ สุดทองคง, 2539) เนื่องจากเกษตรกรผู้เลี้ยงได้นำน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งมาใช้ภายในฟาร์มและไม่มีการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ดีพอก่อนนำน้ำเข้าไปใช้ภายในฟาร์ม จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

จากปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรียจึงจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง ซึ่งจะนำไปสู่การจัดการและควบคุมโรคได้อย่างเหมาะสม และวิธีการที่สามารถตรวจวินิจฉัยโรคอย่างได้ผลรวดเร็วถูกต้องแม่นยำและต้นทุนถูก วิธีหนึ่ง คือ การตรวจด้วยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันโดยอาศัยคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีและแอนติเจนซึ่งแอนติบอดีที่ใช้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์เริ่มต้นเซลล์เดียว เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงสามารถจับกับ epitope เพียง 1 ตำแหน่งบนแอนติเจนของเชื้อไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดอื่นและไม่เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะกับโปรตีนของสัตว์น้ำ โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันมีความไวสูง แม่นยำ และมีรูปแบบกระบวนการวินิจฉัยต่างๆ หลายรูปแบบ ทำให้ง่ายต่อการตรวจและทราบผลอย่างรวดเร็วโดยมีค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถปรับปรุงให้ใช้ได้ง่ายโดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญมากของผู้ที่นำไปใช้ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) ซึ่งการนำแอนติบอดีที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ จะมีประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรค รวมถึงประโยชน์ทางธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไปในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11Eที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรง (*V. harveyi* 1526 เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E) แต่ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นหรือแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ (Phianphak et al., 2005) สามารถนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรงจากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dot blotting และ Western blotting และยืนยันผลการจำแนกชนิด *V. harveyi* โดยวิธี Biochemical Test ร่วมกับ api ® 20 E

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม เพื่อทำการทดสอบการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH 26-11 E (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง

1.1 *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรง 1 สายพันธุ์กับสายพันธุ์อื่นที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

1.2 *Vibrio* spp. สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 15 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2)

1.3 แบคทีเรียที่ไม่ใช่วิบริโอ (non-Vibrio bacteria) ชนิดต่างๆ จำนวน 9 ชนิด (ตารางที่ 3)

1.4 *Vibrio* spp. ที่เจริญบนอาหาร TCBS แยกได้จากอวัยวะของสัตว์น้ำต่างๆ เช่น ตับกุ้ง ไตปลา ระบบย่อยอาหารของหอย และลำตัวของเพรียงทราย อาร์ทีเมีย จำนวน 21 ชนิด จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแหล่งต่างๆ (ตารางที่ 4)

นำแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่มเลี้ยงลงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 10^8-10^9 $CFUml^{-1}$ เพื่อทำ Dot blotting และ Western blotting

2. การทดสอบการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E โดยวิธี Dot blotting (ดัดแปลงจาก ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

นำแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม มาหยดบน Nitrocellulose membrane 1 ไมโครลิตรต่อจุด (ใช้ *V. harveyi* 1526 ชนิดที่ก่อโรครุนแรงจากมหาวิทยาลัยมหิดล เป็น positive control) ทิ้งให้แห้ง แช่ใน Blocking solution (5% nonfat dry milk in PBS) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS - TW 20 (0.05% Tween-20 in PBS) นาน 5 นาที 3 ครั้ง และบ่มด้วยโมโนโคนอลแอนติบอดี VH26-11E เจือจาง 1:200 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ˚C ล้างด้วย PBS - TW 20 นาน 5 นาที 3 ครั้ง นำไปบ่มต่อใน Goat Anti Mouse (GAM-HRP; Jackson Immuno Research Laboratories, INC.) เจือจาง 1:1000 นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS - TW 20 นาน 5 นาที 3 ครั้ง นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายผสม Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 3 มิลลิกรัม, $CoCl_2$ 10 ไมโครลิตร และ H_2O_2 10 ไมโครลิตร ใน PBS 10 มิลลิลิตร นาน 5 นาที เชื้อ *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรง จะเกิดจุดสีเทาเข้ม

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งก่อโรครุนแรงกับสายพันธุ์อื่นๆ ที่รวบรวมได้ ด้วย MAb VH26-11E โดยวิธี Dot blotting และ Western blotting

ลำดับ	ชนิดของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Dot blotting	Western blotting
1	*V. harveyi* 1526	มหาวิทยาลัยมหิดล	+	+
2	*V. harveyi* ฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี	กรมประมง	+	+
3	*V. harveyi* KCTC 2717	ประเทศเกาหลี	-	-
4	*V. harveyi* VHS1	มหาวิทยาลัยมหิดล	-	-
5	*V. harveyi* HLV	สถานีประมงท่าแฉลบ จันทบุรี	-	-
6	*V. harveyi* IBN	สถานีประมงท่าแฉลบ จันทบุรี	-	-
7	*V. harveyi* PBN	สถานีประมงท่าแฉลบ จันทบุรี	-	-
8	*V. harveyi* 47666-1	สหราชอาณาจักร	-	-

หมายเหตุ : (+ : positive), (- : negative)

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ *Vibrio* spp. 15 สายพันธุ์ ด้วย MAb VH26-11E โดยวิธี Dot blotting และ Western blotting

ลำดับ	ชนิดของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Dot blotting	Western blotting
1	*V. vulnificus* DMST 5852	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	-	-
2	*V. vulnificus* biotype 1	ห้องปฏิบัติการโรคและพยาธิสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ม.บูรพา	-	-
3	*V. vulnificus* biotype2	ห้องปฏิบัติการโรคและพยาธิสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ม.บูรพา	-	-
4	*V. vulnificus* BT 2 –89/04/7052	ประเทศเดนมาร์ก	-	-
5	*V. vulnificus* MT 1506	สหราชอาณาจักร	-	-
6	*V. cholerae* ogawa	กรมประมง	-	-
7	*V. cholerae* O 139	กรมประมง	-	-
8	*V. cholerae* Inaba	กรมประมง	-	-
9	*V. alginolyticus* DMST 14800	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	-	-
10	*V. parahaemolyticus* DMST 15285	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์	-	-
11	*V. parahaemolyticus* strain 3 G	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จันทบุรี	-	-
12	*V. parahaemolyticus* strain C 646	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จันทบุรี	-	-
13	*V. parahaemolyticus* cect 5034	สหราชอาณาจักร	-	-
14	*V. anguillarum* AVL 01	สหราชอาณาจักร	-	-
15	*V. ordalii* vib 02	สหราชอาณาจักร	-	-

หมายเหตุ : (- : negative)

ตารางที่ 3 การตรวจสอบแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่วิบริโอ ด้วย MAb VH26-11E โดยวิธี Dot blotting และ Western blotting

ลำดับ	ชนิดของแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	Dot blotting	Western blotting
1	*Aeromonas hydrophila*	สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำแห่งประเทศไทย	-	-
2	*Edwardsiella tarda* B 88308	สหราชอาณาจักร	-	-
3	*Yersinia yuckeri* B 04023	สหราชอาณาจักร	-	-
4	*Photobacterium damsela piscicida*	สหราชอาณาจักร	-	-
5	Unknown bacteria 1	ไตปลากะพงขาว ปราโมทย์ฟาร์ม	-	-
6	Unknown bacteria 2	ทางเดินอาหารปูม้าโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	-	-
7	Unknown bacteria 3	ทางเดินอาหารปูม้าโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	-	-
8	Unknown bacteria 4	ทางเดินอาหารปูม้าโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	-	-
9	Unknown bacteria 5	ทางเดินอาหารปูม้าโรงโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	-	-

หมายเหตุ : (- : negative)

ตารางที่ 4 การตรวจสอบ *Vibrio spp.* ที่เจริญบนอาหาร TCBS ที่แยกได้จากสัตว์น้ำทั้ง 21 ชนิด จากระบบการเพาะเลี้ยงแหล่งต่างๆ

ลำดับ	ชนิดของสัตว์น้ำ (อวัยวะ) ที่ใช้แยกแบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ลักษณะอาการ	สีโคโลนีบนTCBS	Dot blotting	Western blotting
1	อาร์ทิเมีย	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล	ปกติ	สีเหลือง	-	-
2	กุ้งกุลาดำ P13B	มานพฟาร์ม หาดวอนนภา	ปกติ	สีเหลือง	-	-
3	กุ้งกุลาดำ P13WS	มานพฟาร์ม หาดวอนนภา	ปกติ	สีเหลือง	-	-
4	กุ้งกุลาดำ P13CS	มานพฟาร์ม หาดวอนนภา	ปกติ	สีเหลือง	-	-
5	กุ้งกุลาดำ 1 (Hepatopancreas)	ระยอง	ปกติ	สีเหลือง	-	-
6	กุ้งกุลาดำ 2 (Hepatopancreas)	ระยอง	ปกติ	สีเขียว	-	-
7	กุ้งกุลาดำ 3 (Hepatopancreas)	ระยอง	ปกติ	สีเขียว	-	-
8	กุ้งกุลาดำ 4 (Hepatopancreas)	บ่อคุณวิรัช บางคล้า	ปกติ	สีเขียว	-	-
9	กุ้งกุลาดำ 5 (Hepatopancreas)	จันทบุรี	ปกติ	สีเขียว	-	-
10	กุ้งกุลาดำ 6 (Hepatopancreas)	โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	ปกติ	สีเหลือง	-	-
11	กุ้งกุลาดำ 7 (Hepatopancreas)	บ่อคุณวี บางคล้า	ปกติ	สีเขียว	-	-
12	ปูม้าระยะซูเอีย 1	โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	ระยางค์กร่อน	สีเขียว	-	-
13	ปูม้าระยะซูเอีย 2	โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ม.บูรพา	ระยางค์กร่อน	สีเหลือง	-	-
14	หอยแมลงภู่ 1 (ทางเดินอาหาร)	อ่างศิลา	ปกติ	สีเขียว	-	-
15	หอยแมลงภู่ 2 (ทางเดินอาหาร)	อ่างศิลา	ปกติ	สีเหลือง	-	-
16	หอยนางรม 1 (ทางเดินอาหาร)	อ่างศิลา	ปกติ	สีเขียว	-	-
17	หอยนางรม 2 (ทางเดินอาหาร)	อ่างศิลา	ปกติ	สีเหลือง	-	-
18	ลำตัวเพรียงเลือด	ตลาดหนองมน	ปกติ	สีเขียว	-	-
19	ลำตัวเพรียงทราย	ตลาดหนองมน	ปกติ	สีเหลือง	-	-
20	ปลากะพงขาว 5	บางปะกง	ตาขุ่น ตกเลือด	สีเขียว	-	-
21	ปลากะพงขาว 6	บางปะกง	ตาขุ่น	สีเขียว	-	-

หมายเหตุ ; - : negative

3. การทดสอบการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E โดยวิธี Western blotting (ดัดแปลงจาก ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

นำแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม (10^9 $CFUml^{-1}$) ปั่นที่ 1500 g 20 นาที ละลายกับ 10% SDS แล้วนำมาปั่นที่ 1500 g 5 นาที ดูดสารละลายใสที่ด้านบนมาผสมกับ sample buffer (4x) อัตราส่วน 3:1 (10^7 $CFUml^{-1}$) เก็บรักษาที่ -20 ˚C กระทั่งใช้งาน จากนั้นนำแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม มาแยกใน 12% เจล ในกระบวนการ SDS-PAGE โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 120 โวลท์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายแบนโปรตีนจาก SDS-PAGE ลงบนกระดาษ Nitrocellulose membrane โดยวิธี Western blot แบบ semidry ปล่อยกระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลล์ 45 นาที แล้วนำกระดาษ Nitrocellulose membrane มาแช่ใน Blocking solution ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ล้างด้วย PBS-TW 20 นาน 5 นาที 3 ครั้ง จากนั้นนำมาบ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E เจือจาง 1:200 นาน 1 ชั่วโมง และบ่มใน GAM-HRP เจือจาง 1:1000 นาน 1 ชั่วโมงจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนเช่นเดียวกับการทำ Dot blotting

4. การจำแนกเพื่อยืนยันเชื้อโดยใช้การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมกับ api ® 20 E (bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, France)

นำ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่างๆ มาเตรียมและทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่างๆ ดัดแปลงจากวิธีของ (Baumann *et al.*, 1984) และขั้นตอนตามระบุในคู่มือการใช้ api ® 20 E และอ่านผลจาก APILAS Plus Software (ตารางที่ 5)

ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรง ด้วยวิธี Dot blotting และ Western blotting โดยการตรวจสอบ *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรงกับสายพันธุ์อื่นที่รวบรวมได้ พบว่า *V. harveyi* 1526 จากมหาวิทยาลัยมหิดล และ *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี ให้ผลเป็นบวก ส่วน *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นๆ ให้ผลเป็นลบ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1 และ 2)

ส่วนการตรวจสอบ *Vibrio* spp. สายพันธุ์ต่างๆ 15 สายพันธุ์, การตรวจสอบแบคทีเรียที่ไม่ใช่วิบริโอ และการตรวจสอบ *Vibrio* spp. ที่เจริญบนอาหาร TCBS ที่แยกจากสัตว์น้ำ 21 ชนิด จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์นั้น พบว่าให้ผลเป็นลบทั้งหมด ดังตารางที่ 2, 3 และ 4

จากการตรวจยืนยันทาง Biochemical Test ร่วมกับ api ® 20 E เปรียบเทียบระหว่าง *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรงซึ่งมี *V. harveyi* 1526 เป็นตัวแทน กับ *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทุกการทดสอบให้ผลเหมือนกับ *V. harveyi* 1526 และบางการทดสอบต่างกันกับ *V. harveyi* สายพันธุ์อื่น (ตารางที่ 5)

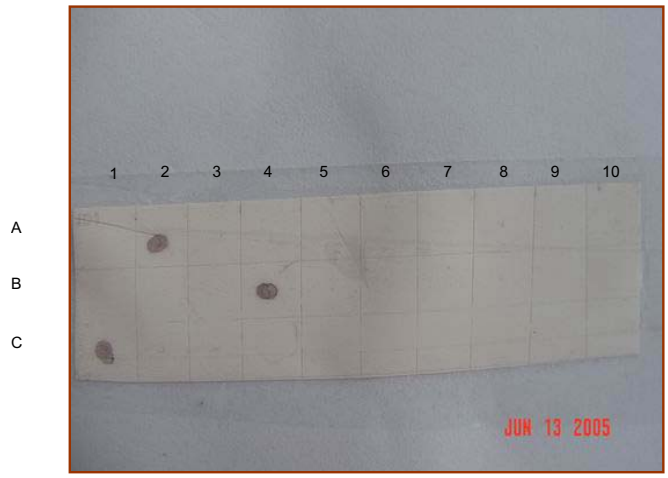
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E มาเป็นเครื่องมือในการจำแนก *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรงในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้เทคนิค Dot blotting และ Western blotting พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ *V. harveyi* 1526 ซึ่งเป็นชนิดที่ใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E และ *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับ *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ 6 สายพันธุ์, *Vibrio* spp. 15 สายพันธุ์, แบคทีเรียที่ไม่ใช่วิบริโอ 9 ชนิดและ *Vibrio spp.* ที่เจริญบนอาหาร TCBS จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 21 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Phianphak (2005) ได้ใช้ *V. harveyi* 639 และ 1526 ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 8-95 kDa โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้มี 31 ชนิด แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม หนึ่งในจำนวนนั้นคือ VH26-11E ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 8 kDa ของ *V. harveyi* 1526 โดยไม่แสดงปฏิกิริยาข้ามต่อ *Vibrio* spp. และแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ จากการทดลองเห็นได้ว่ามีเพียงเชื้อ *V. harveyi* 1526 ซึ่งเป็นชนิดที่ใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E และ *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานีเท่านั้นที่มีสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E ได้ ส่วน *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ และ *Vibrio* spp. (ที่ถูกจำแนกแล้ว เช่น *V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. cholerae, V. alginolyticu*s เป็นต้น) รวมถึงแบคทีเรียที่ไม่ใช่วิบริโอที่นำมาทดสอบนั้นไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E แสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E มีความจำเพาะต่อ *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรง และมี cross reactivity กับ *V. harveyi* จากสุราษฎร์ธานี ซึ่งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบร่วมนั้นมี epitope ต่างจาก epitope ของ *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรงจึงไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E ซึ่งโดยหลักการของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นจะมีความจำเพาะต่อ epitope ชนิดใดชนิดหนึ่งของแอนติเจนเท่านั้น (สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ, 2542)

ตารางที่ 5 การตรวจสอบ *V. harveyi* ชนิดที่ก่อโรครุนแรงและไม่ก่อโรครุนแรงด้วยวิธี Biochemical Test ร่วมกับ api ® 20

Tests	*V. harveyi*							
	1526	สุราษฎร์ธานี	KCTC 2717	VHS1	HLV	IBN	PBN	47666-1 UK
Growth on TCBS agar	G	G	Y	G	G	G	G	G
Luminescence (on NA)	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase*	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylase*	+	+	+	+	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase*	+	+	+	-	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction*	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole*	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	K/A	K/A	A/A	A/A	A/A	K/A	A/A	A/A
OF*	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer*	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-
Enzyme production:								
Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase*	+	+	+	+	+	+	+	+
Sensitivity to:								
0/129 (10 μg)	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicillin (10 μg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Growth at:								
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose*	-	-	-	-	+	+	+	-
Arabinose*	-	-	-	-	+	+	+	-
Sorbitol*	-	-	-	-	+	+	+	-
Urease*	-	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : K:Alkaline, A:Acid, +: positive, - : negative, S: sensitive, R: resistance, G: Green Colony, Y: Yellow Colony,
* : ทดสอบด้วยชุด api ® 20 E



ภาพที่ 1 Dot blotting ของการตรวจสอบ *V. harveyi* ระหว่าง ชนิดที่ก่อโรครุนแรงกับสายพันธุ์อื่นโดยผลบวกจะเห็นเป็นจุดสีเทาเข้ม แถว A2 เป็น *V. harveyi* 1526 แถว B4 และ C1 เป็น *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี

แถว A : (1) *V. harveyi* KCTC 2717 (2) *V. harveyi* 1526 (3) *V. vulnificus* Biotype 1 (4) *V. vulnificus* Biotype 2 (5) *V. vulnificus* DMST 5852 (6) *V. alginolyticus* DMRT 14800 (7) *V. cholerae* Inaba (8) *V. cholerae* 0139 (9) *V. cholerae* ogawa (10) *V. parahaemoliticus* DMST 15285

แถว B : (1) *A. hydrophila* (2) *V. parahaemoliticus* strain 3 G (3) *V. parahaemoliticus* strain C 646 (4) *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี (5) *V. harveyi* 47666-1 (6) Unknown bacteria 3 จากปูม้า (7) Unknown bacteria 4 จากปูม้า (8) Unknown bacteria 1 จากปูม้า (9) Unknown bacteria 2 จากปูม้า (10) *V. ordalii* vib 02

แถว C : (1) *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี (2) *V. harveyi* VHS1 (3) *V. harveyi* PBN (4) *V. harveyi* HLV (5) *V. harveyi* IBN (6) *V. anguillarum* AVL 01 (7) ปูม้าระยะซูเอีย 2 (8) กุ้งกุลาดำ 1 (Hepatopancraes) (9) หอยนางรม 2 (ทางเดินอาหาร) (10) กุ้งกุลาดำ 3 (Hepatopancraes)

ภาพที่ 2 Western Blotting ของการตรวจสอบ *V. harveyi* ระหว่าง ชนิดที่ก่อโรครุนแรงกับสายพันธุ์อื่น ซึ่งแถว 2 เป็น *V. harveyi* 1526 และ แถว 8 เป็น *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยผลบวกจะเห็นเป็นแถบสีน้ำตาลที่ 8 kDa แถว (1) Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range 92290 (BIO-RAD) (2) *V. harveyi* 1526 (3) *V. alginolyticus* DMRT 14800 (4) ลำตัวเพรียงเลือด (5) *V. harveyi* KCTC 2717 (6) กุ้งกุลาดำ 5 (Hepatopancraes) (7) กุ้งกุลาดำ 3 (Hepatopancraes) (8) *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี (9) *V. harveyi* 47666-1 (10) ปูม้าระยะซูเอีย 2

ส่วนการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E นั้นมาตรวจ *Vibrio* spp. ที่เจริญบนอาหาร TCBS ที่แยกได้จากสัตว์น้ำจากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ จากกุ้ง หอย ปู ปลา แม่เพรียงและอาร์ทีเมีย นั้นไม่เกิดปฏิกิริยา แสดงว่า *Vibrio* spp. เหล่านี้อาจเป็น *Vibrio* spp. อื่นๆ ที่ไม่ใช่ *V. harveyi* หรือเป็น *V. harveyi* ที่ไม่ใช่ชนิดที่ก่อโรครุนแรง ทั้งนี้เนื่องจาก *V. harveyi* ที่แยกได้จากระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำย่อมมีชนิดที่ไม่ก่อโรค โดยปกติแล้วเชื้อแบคทีเรียมีอยู่ทั่วไปในน้ำและในตัวสัตว์น้ำเอง สัตว์น้ำจะไม่แสดงอาการป่วย เนื่องจากความสมดุลของตัวสัตว์น้ำและตัวเชื้อแบคทีเรีย ส่วน *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรงจะพบและทำให้สัตว์ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตายได้นั้น เพราะมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่เอื้ออำนวยต่อการระบาดของโรค ซึ่งลิลาและคณะ (2540) กล่าวว่า เชื้อโรคจะมีปริมาณมากหรือน้อยในน้ำขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณธาตุอาหารในน้ำ ความเป็นกรด เป็นด่าง ความเค็มอุณหภูมิของน้ำ ฤดูกาล หรือในสภาวะที่สัตว์น้ำเกิดความเครียดเชื้อก็จะเข้าซ้ำเติม ก่อให้เกิดอาการต่างๆ ได้ ทั้งนี้ตัวอย่างของสัตว์ที่เก็บมาก็ไม่มีการแสดงอาการป่วยใดใด

จากการยืนยันผลทางชีวเคมีของ *V. harveyi* ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าการทดสอบส่วนใหญ่ให้ผลคล้ายกันคือ แบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ (Liu *et al.*,1996) และให้โคโลนีสีครีมบนอาหาร TSA agar สามารถเคลื่อนที่โดยใช้ flagella ให้เอนไซม์ Oxidase, Amylase, Gelatinase ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและ พลังงาน เติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถเรืองแสงได้ในที่มืดโดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543) ไวต่อยาปฏิชีวนะ 2, 4 diamino-6, 7-di-isopropyl pteridine phosphate (0/129) ให้ผลบวกกับการทดสอบ Oxidase, Nitrate reduction, Indole, เจริญได้ที่ 0.5-8% NaCl, MacConkey ให้ผลลบกับการทดสอบ Arginine dihydrolase, Catalase, Voges-Proskauer, H2S, Urease (Lightner, 1996) ส่วนการทดสอบของแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ให้ผลแตกต่างกันคือ สีของโคโลนีบนอาหาร TCBS ทุกสายพันธุ์ให้โคโลนีสีเขียว ยกเว้น *V. harveyi* KCTC 2717 จากประเทศเกาหลี ที่ให้โคโลนีสีเหลือง และการทดสอบ Lysine decarboxylase, Ornithine decarboxylase, TSI, Sucrose, Arabinose และ Sorbitol (ตารางที่ 5) จากผลการทดสอบเห็นได้ว่า *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทุกการทดสอบให้ผลคล้ายกับ *V. harveyi* 1526 และมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยกับ *V. harveyi* สายพันธุ์อื่นที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ซึ่ง *V. harveyi* 1526 ความเข้มข้น 10^7 CFU ml^{-1} สามารถทำให้จำนวนกุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 43 ชั่วโมง (Phianphak *et al.*, 2005) ส่วน *V. harveyi* จากฟาร์มกุ้งกุลาดำจังหวัดสุราษฎร์ธานี ความเข้มข้น 10^9 CFU ml^{-1} สามารถทำให้จำนวนกุ้งกุลาดำตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง (สุกัญญา จันคูเมือง, 2550) รวมทั้งแสดงว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E สามารถจำแนก *V. harveyi* ที่ก่อโรคในสัตว์น้ำได้

อนึ่งในกรณีที่ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH26-11E สำหรับตรวจหา *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรง ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นควรตรวจสอบสัตว์น้ำที่แสดงอาการของโรค และควรทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* ชนิดที่ไม่ก่อโรคด้วย เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการระบาดของในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัย ควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ *V. harveyi* ที่ก่อโรครุนแรง ในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). *กุ้งไทย 2000*. เจริญรัฐการพิมพ์ กรุงเทพฯ. 43.

ชัยวุฒิ สุดทองคง. (2539). *การแยกชนิดและการดื้อยาของแบคทีเรียเรืองแสงในบริเวณแหล่งน้ำชายฝั่งของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 109.

ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). *วิทยาภูมิคุ้มกัน*. กรุงเทพ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. 90-91.

ลิลา เรืองแป้น, ชัยวุฒิ สุดทอง และยุบลรัตน์ ศรีแก้ว. (2540). แบคทีเรียเรืองแสงในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จังหวัดสงขลา. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 18/2540 สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจังหวัดสงขลา*, ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสมุทรปราการ. กรมประมง. 10.

สุกัญญา จันคูเมือง. (2550). *การสำรวจความรุนแรงของเชื้อ Vibrio harveyi ระหว่างกุ้งและปลา*. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์, ภรารัชต์ ธารากุล และสิริฤกษ์ ทรงศิริไล. (2542). โมโนโคลนอลแอนติบอดี. *อิมมูโนวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 4 หนที่ 3. กรุงเทพฯ. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore. Williams & Wilkins. 1268.

Lightner, D.V. (1996). *A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of penaeid shrimp*. Baton Rouge, LA : World Aquaculture Society, 236.

Liu, P.C., Lee, K.K., & Chen, S.N. (1996). Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*. *22*, 413-416.

Phainphak W., Rengpipat S., Rukpratanporn S., Longyant S., Chaivisuthangkura P., Sithigorngul W., & Sithigorngul P. (2005). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. *63*,161-168.