การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Flavobacterium columnare* สาเหตุของโรคคอลัมนาริส

DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO*Flavobacterium columnare* CAUSING COLUMNARIS DISEASE

นันต์ธวุฒิ พลภักดี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Flavobacterium columnare* สาเหตุของโรคคอลัมนาริส

นันต์ธวุฒิ พลภักดี

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO*Flavobacterium columnare* CAUSING COLUMNARIS DISEASE

NANTAWUT PONPUKDEE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Biotechnology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Flavobacterium columnare* สาเหตุของโรคคอลัมนาริส

ของ

นันต์ธวุฒิ พลภักดี

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Flavobacterium columnare* สาเหตุของโรคคอลัมนาริส
ผู้วิจัย	นันต์ธวุฒิ พลภักดี
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล

Flavobacterium columnare เป็นสาเหตุของโรคคอลัมนาริสที่เกิดขึ้นในปลาน้ำจืดทั่วโลก ซึ่งส่งผลกระทบอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แบคทีเรียดังกล่าวจะทำให้เกิดแผลบริเวณผิวหนัง ครีบ และเหงือกของปลาที่ติดเชื้อ ส่งผลให้มีอัตราการตายเกิดขึ้นตั้งแต่ 60-100% ดังนั้นการตรวจหาเชื้อ *F. columnare* ที่ง่าย ถูกต้อง รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และราคาถูกจะเป็นเครื่องมือสำหรับการป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคนี้ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *F. columnare* สำหรับนำไปพัฒนาเป็นเครื่องในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยใช้ outer membrane protein (OMP) ของเชื้อ *F. columnare* ในการปลูกภูมิคุ้มกัน ซึ่งหนูขาวที่ถูกปลูกภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองต่อแอนติเจนสูงจึงนำไปผลิตเป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *F. columnare* ในงานวิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งสิ้น 6 กลุ่มโดยที่ 4 กลุ่มของโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถจับอย่างจำเพาะกับเชื้อ *F. columnare* อีก 2 กลุ่มเกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับ *F. indicum* ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 และ 3 สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *F. columnare* ในเนื้อเยื่อของปลาด้วยวิธี immunohistochemistry ได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting อยู่ที่ 10^6-10^7 cfu/mL ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อ *F. columnare* ในปลาติดเชื้อได้ โดยไม่ต้องอาศัยการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ

คำสำคัญ : ฟลาโวแบคทีเรียมคอลัมแนร์, โรคคอลัมนาริส, โมโนโคลนอลแอนติบอดี, dot blotting, Western blotting, Immunohistochemistry

Title	DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO*Flavobacterium columnare* CAUSING COLUMNARIS DISEASE
Author	NANTAWUT PONPUKDEE
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Associate Professor Siwaporn Longyant , Ph.D.
Co Advisor	Professor Paisarn Sitthigorngul , Ph.D.

Flavobacterium columnaris is a common pathogenic bacterium that causes columnaris disease in freshwater fish. Outbreaks of this disease result in devastating losses in aquaculture with a mortality rate of approximately 60-100%. The infected fish usually show lesions on the external body surface and gills such as skin damage, fin rot, and gill necrosis. The aims of this study were to produce monoclonal antibody (MAb) specific to *F. columnaris* for the development of high-efficiency immuno-based assays for the detection of the disease. The outer membrane protein (OMP) preparation was used for immunization and the splenocytes from the highest response mouse was used for MAb production. Six different groups of MAbs bound to all isolates of *F. columnaris* were obtained in this study: four of them were specific only *F. columnaris* while the other two groups demonstrated cross-reactivity to *F. indicum*. MAbs in group 1 and 3 could be used to detect the infection of the tissues by immunohistochemistry. The limited detection of these MAbs were ranged from 10^6-10^7 cfu/ml as determined by dot blot assays. The detection of this pathogen could be performed directly in infected tissues without the requirement of bacterial isolation.

Keyword : Flavobacterium columnare, columnaris disease, Monoclonal antibody, dot blotting, Western blotting, Immunohistochemistry

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือรวมถึงคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอบรมให้ความรู้ในการศึกษาและการทำวิจัย อีกทั้งคอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ ทำให้การทำปริญญานิพนธ์นี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน ที่ให้เกียรติมาเป็นประธานในการสอบปริญญานิพนธ์และให้คำแนะนำสำหรับการแก้ไขปริญญานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ชาญณรงค์ รอดคำ ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำสำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.ประดิษฐ์ หวังมาน ผู้ซึ่งคอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือแก้ปัญหา และถ่ายทอดเทคนิคต่าง ๆ ทั้งในห้องปฏิบัติการและงานเอกสาร อีกทั้งยังได้แบ่งปันความรู้และประสบการณ์ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) (Science Achievement Scholarship of Thailand; SAST) ที่ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ผู้วิจัยได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา ครอบครัวอันเป็นที่รัก ที่เป็นกำลังใจ สนับสนุน และเป็นแรงผลักดันให้ก้าวข้ามผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และขอบคุณมิตรภาพของเพื่อน ๆ ที่ช่วยสนับสนุน ให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้เสมอมา สุดท้ายนี้ขอให้กุศลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ อุทิศเป็นกุศลแก่สัตว์ทดลองที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของผู้วิจัยในครั้งนี้

นันต์ธวุฒิ พลภักดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูปภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของการวิจัย 3

ความสำคัญของการวิจัย 3

ขอบเขตการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1. อนุกรมวิธานแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* 4

2. ประวัติการค้นพบ *Flavobacterium columnare* 4

3. สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Flavobacterium columnare* 6

4. การระบาดของโรคคอลัมนาริส 8

5. อาการ รอยโรค และการเกิดโรคคอลัมนาริส 10

5.1 อาการ รอยโรค 10

5.2 การเกิดโรคคอลัมนาริส 13

6. โฮสต์ 13

7. ปัจจัยในการเกิดโรคคอลัมนาริส 15

8. กลไกการเกิดโรคคอลัมนาริส 15
8.1 การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย (colonization) 16
8.2 การเกิดท็อกซิน (toxin) 18
8.3 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน 19
9. การตรวจวินิจฉัยโรคคอลัมนาริส 21
9.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 21
9.2 การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา 21
9.3 การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา 23
9.4 การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา 24
10. การป้องกันและรักษาโรคคอลัมนาริส 25
10.1 การป้องกันโรคคอลัมนาริส 25
10.2 การรักษาโรคคอลัมนาริส 28
11. โมโนโคลนอลแอนติบอดี 29
11.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 29
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 31
1. สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย 31
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 33
3. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย 34
4. วิธีดำเนินการวิจัย 36
4.1 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* 36
4.1.1 การสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย 36
4.1.2 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 37

4.2 การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว 38
4.2.1 การเตรียมแบคทีเรีย 38
4.2.2 การสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก 39
4.2.3 การปลูกภูมิคุ้มกัน 39
4.2.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting 40
4.3 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 40
4.4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา 41
4.4.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting 41
4.4.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting 42
4.4.3 การคัดเลือกขั้นที่ 3 ด้วยวิธี immunohistochemistry 42
4.4.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution 46
4.4.5 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา 46
4.5 การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 47
4.5.1 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting 47
4.5.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA 47
4.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting 50
5. การทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* จากปลาหางนกยูงที่ชักนำให้มีการติดเชื้อด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 51
5.1 การเตรียมตัวอย่างปลาหางนกยูงโดยการชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย 51
5.2 การทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ในปลาหางนกยูงด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 51
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 53

1. การตรวจสอบแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* 53
2. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว 54
2.1 การสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก 54
2.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting 54
3. การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา 56
4. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 57
4.1 ผลของการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting 57
4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA 62
4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting 63
4.4 การเปรียบเทียบการตรวจสอบการติดเชื้อ *Flavobacterium columnare* ในปลาหางนกยูงที่ชักนำให้ติดเชื้อ ด้วยวิธี dot blotting และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 64
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 66
บรรณานุกรม 70
ภาคผนวก 84
ภาคผนวก ก 85
ภาคผนวก ข 88
ภาคผนวก ค 90
ภาคผนวก ง 93
ภาคผนวก จ 98
ภาคผนวก ฉ 100
ภาคผนวก ช 102
ประวัติผู้เขียน 104

สารบัญตาราง

ตาราง 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* 6

ตาราง 2 โฮสต์ของแบคทีเรีย *F. columnare* 14

ตาราง 3 แบคทีเรียที่ใช้ในการเตรียมแอนติเจนและใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) 31

ตาราง 4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 33

ตาราง 5 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย 34

ตาราง 6 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 37

ตาราง 7 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 38

ตาราง 8 คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 62

ตาราง 9 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel 96

สารบัญรูปภาพ

ภาพประกอบ 1 ลักษณะของแผลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* บริเวณเหงือกของปลาแซลมอน 11

ภาพประกอบ 2 เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของปลาติดเชื้อ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบกราด แสดงให้เห็นรูปร่างของแบคทีเรีย *F. columnare* 12

ภาพประกอบ 3 ลักษณะของ แบคทีเรีย *F. columnare* ที่เลี้ยงใน TYES broth ซึ่งย้อมด้วยสีย้อมแกรม 22

ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิธี immunohistochemistry 44

ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการย้อมสีด้วยวิธี immunohistochemistry 45

ภาพประกอบ 6 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี 49

ภาพประกอบ 7 รูปแบบการหยดแอนติเจนเพื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting 50

ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตต่าง ๆด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 53

ภาพประกอบ 9 การตรวจสอบโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี SDS-PAGE และการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting โดย 55

ภาพประกอบ 10 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆที่ผลิตได้ด้วยวิธี Western blotting 57

ภาพประกอบ 11 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting 58

ภาพประกอบ 12 เนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* 59

ภาพประกอบ 13 เนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้ของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* 60

ภาพประกอบ 14 เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* 61

ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting 63

ภาพประกอบ 16 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting (A) เทียบกับผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (B) 65

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืดเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยมีการส่งออกทั้งในรูปแบบของ เนื้อปลาสด เนื้อปลาแช่แข็ง ปลาสด ปลาแช่เย็น ปลาแช่แข็ง และผลิตภัณฑ์ที่มีการแปรรูปแล้ว เช่น ปลาแห้ง ปลารมควัน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการส่งออกลูกพันธุ์ปลาไปยังประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ซึ่งในปี พ.ศ. 2562 กระทรวงพาณิชย์รายงานว่าผลิตภัณฑ์จากปลาดังกล่าวมีมูลค่าการส่งออกกว่า 36,125 ล้านบาท ปัจจุบันประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะขยายการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อสร้างรายได้ให้กับประเทศเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากตลาดทั่วโลกมีความต้องการผลิตภัณฑ์จากปลาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์จากปลาในปี พ.ศ. 2561 พบว่ามีมูลค่าการส่งออกลดลงประมาณ 1,000 ล้านบาท ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการแปรปรวนของสภาพอากาศ การแข็งค่าของเงินบาท และสภาพแวดล้อมในบางพื้นที่เริ่มเสื่อมโทรมลง น้ำเน่าเสีย มีการเลี้ยงปลาที่หนาแน่น และการจัดการที่ไม่ดีพอ ทำให้เกิดปัญหาโรคในปลาขึ้น ซึ่งโรคที่พบในการเพาะเลี้ยงปลามีทั้งที่เกิดจากการติดปรสิต เช่น เห็บระฆัง (*Trichodina* sp.), ปลิงใส (*Cichlidogyrus* sp.) การติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*, แบคทีเรีย *Streptococcus* sp. และแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* นอกจากนี้ยังพบโรคที่เกิดจากการติดเชื้อราและไวรัสอื่น ๆ (ชนกันต์, 2013)

โรคคอลัมนาริส (columnaris disease) มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีเส้นใย โคโลนีมีสีเหลือง รูปร่างเป็นแท่งเรียว ยาวประมาณ 3-10 ไมครอน กว้าง 0.3-0.5 ไมครอน มีการพบครั้งแรกในบาดแผลของปลาน้ำอุ่นในแม่น้ำมิสซิสซิปปีประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2465 ในปัจจุบันพบรายงานการระบาดของโรคคอลัมนาริสเกิดขึ้นทั่วโลก สร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและยังส่งผลกระทบต่อปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ (Pongnumpai & Chitmanat, 2017) โดยโรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งกับปลาแรกเกิดและปลาตัวเต็มวัย ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในบริเวณน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 15-25ºC อย่างไรก็ตามพบการเกิดโรคคอลัมนาริสในปลาแซลมอลที่เลี้ยงบริเวณน้ำเย็นซึ่งมีอุณหภูมิ 12-15ºC โดยแบคทีเรีย *F. columnare* จะสร้างความเสียหายต่อเหงือก และผิวหนังของปลา ทำให้เกิดแผลบริเวณปากส่งผลให้ปลาไม่กินอาหารและตายในที่สุด ซึ่งพบว่าโรค

คอลัมนาริสมีอัตราการตายเกิดขึ้นตั้งแต่ 60-100% ขึ้นอยู่กับความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย *F. columnare* แต่ละไอโซเลต สำหรับการระบาดของโรคคอลัมนาริสนั้นส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงปลาไม่เหมาะสม เนื่องมาจากความหนาแน่นในการเลี้ยงปลามากจนเกินไปทำให้มีปริมาณออกซิเจนในน้ำอยู่ในระดับต่ำ หรืออาจเกิดจากมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมในแหล่งน้ำสูง (Lafrentz, Goodwin, & Shoemaker, 2012)

จากสถานการณ์ดังกล่าว การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *F. columnare* ที่มีความถูกต้อง รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และราคาถูก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวางแผนเพื่อป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคคอลัมนาริส อย่างไรก็ตามในปัจจุบันสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ได้หลายวิธีด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยาซึ่งเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการตรวจต่อตัวอย่างไม่สูงมาก แต่วิธีนี้ใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์และผลที่ได้อาจไม่ถูกต้อง 100% เนื่องจากต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูงเพื่อแยกแยะความแตกต่างของแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมี การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่มีความไว และมีความถูกต้องสูง แต่วิธีการนี้ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเช่นกัน และมีต้นทุนในการตรวจต่อตัวอย่างที่สูง (Declercq, Haesebrouck, Van, Bossier, & Decostere, 2013)

ดังนั้นเพื่อช่วยลดต้นทุนของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลาในการตรวจวิเคราะห์โรค การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ที่เป็นสาเหตุของโรคคอลัมนาริส ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรียดังกล่าว จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปพัฒนาเป็นเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไว แม่นยำสูง ใช้เวลาในการตรวจน้อย และเกษตรกรสามารถตรวจได้ด้วยตัวเอง นอกจากนี้ยังมีต้นทุนในการตรวจต่อตัวอย่างที่ถูกลง ซึ่งจะช่วยในการป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคคอลัมนาริสได้ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare*

2. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรีย *F. columnare* โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น dot blotting และ Western blotting

ความสำคัญของการวิจัย

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถนำไปพัฒนาเป็นวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรีย *F. columnare* สำหรับใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรียเพื่อป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคคอลัมนาริสในปลา

ขอบเขตการวิจัย

1. เตรียมแบคทีเรีย *F. columnare* และแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ สำหรับทดสอบปฏิกิริยา

2. เตรียมแบคทีเรีย *F. columnare* เพื่อนำไปสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein) สำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

3. คัดเลือกหนูขาวที่มีการตอบสนองดีที่สุดเพื่อนำไปผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

4. คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และวิธี immunohistochemistry

5. ศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามด้วยวิธี dot blotting การตรวจสอบการทับซ้อนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดในการจับกับอิพิโทปของแอนติเจนด้วยวิธี indirect ELISA การจำแนก class และ subclass ด้วยวิธี sandwich ELISA และการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. อนุกรมวิธานแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare*

แบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* (*F. columnare*) ถูกจัดอยู่ในอาณาจักร (kingdom) Bacteria ไฟลัม (phylum) Bacteroidetes ชั้น (class) Flavobacteria อันดับ (order) Flavobacteriales วงศ์ (family) Flavobacteriaceae และสกุล (genus) *Flavobacterium* (Bernardet et al., 1996) โดยแบคทีเรียในสกุลนี้เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Flavobacterial diseases เป็นที่ยอมรับว่าโรคที่เกิดขึ้นสร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก ซึ่งโรคนี้เกิดจากแบคทีเรีย 3 ชนิดในสกุลนี้ ได้แก่ *F. psychrophilum* เป็นสาเหตุของโรค cold water disease (CWD) และเป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาเรนโบว์เทราต์เกิดอาการเซื่องซึม ไม่กินอาหาร และว่ายน้ำผิดปกติ (rainbow trout fry syndrome: RTFS) สำหรับแบคทีเรีย *F. branchiophilum* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเหงือกในปลา (bacterial gill disease) และแบคทีเรีย *F. columnare* เป็นแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรคคอลัมนาริส (columnaris disease) นอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับแบคทีเรียในสกุล *Flavobacterium* โดยพบว่าอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้ โดยแบคทีเรียที่มีรายงานเพิ่มเติมได้แก่ *F. johnsoniae*, *F. succinicans* และ *F. hydati* (Loch & Faisal, 2015)

2. ประวัติการค้นพบ *Flavobacterium columnare*

โรคคอลัมนาริสได้มีการกล่าวถึงเป็นครั้งแรกใน “a new bacterial disease in freshwater fishes” โดย Herbert Spencer Davis เมื่อปี พ.ศ. 2465 ซึ่งพบในบาดแผลของปลาน้ำอุ่นที่เป็นโรคในแม่น้ำมิสซิสซิปปีประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการอธิบายถึงลักษณะของแบคทีเรียนี้ไว้ว่ามีโครงสร้างคล้ายคอลัมน์ (column-like structures formed) เคลื่อนที่ได้และมีการรวมกันเป็นกลุ่ม จึงตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacillus columnaris* โดยเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่าโรคคอลัมนาริส (Declercq, Haesebrouck, et al., 2013)

ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมาสถานะทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงไปหลายครั้งนับตั้งแต่การค้นพบของ “Davis” โดยในปี พ.ศ. 2487 Ordal และ Rucker ได้แยกแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคคอลัมนาริสในปลาแซลมอน (*Onchorhynchus nerka*) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสารอาหารปริมาณน้อย ๆ ซึ่งทั้งสองคนได้ระบุว่าแบคทีเรียนี้คือ myxobacterium ซึ่งถูกจัดอยู่ในอันดับ Myxobacteria โดยเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาเป็นแท่งยาว เคลื่อนที่แบบคืบคลานบนอาหารแข็งและมีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Chondrococcus columnaris* และต่อมาในปี พ.ศ. 2488 Garnjobst ได้แยกแบคทีเรียก่อโรคที่มีลักษณะเหมือนกับแบคทีเรีย *C. columnaris* แต่ไม่มีการสร้าง microcyst จึงมีการเปลี่ยนวงศ์ของแบคทีเรียนี้เป็นวงศ์ Cytophagaceae ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงชื่อของแบคทีเรียอีกครั้งเป็น *Cytophaga columnaris* (Pongnumpai & Chitmanat, 2017)

ในปี พ.ศ. 2529 มีการจัดกลุ่มแบคทีเรียนี้ใหม่อีกครั้งโดย Bernardet และ Grimont ทั้งสองคนได้จัดแบคทีเรียนี้ให้อยู่ในสกุล *Flexibacter* พร้อมทั้งเปลี่ยนชื่อเป็น *Flexibacter columnaris* และในที่สุด ปี พ.ศ. 2539 แบคทีเรียที่ก่อโรคคอลัมนาริสได้รับการจัดจำแนกอีกครั้งโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ-อาอาร์เอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-rRNA hybridization) โปรตีน และ กรดไขมัน ทำให้แบคทีเรีย *Flexibacter columnaris* เปลี่ยนชื่อเป็น *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al., 1996) นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2542 แบคทีเรีย *F. columnare* ถูกแบ่งย่อยเป็น 3 genomovars ตามความแตกต่างในลำดับ *16S rDNA* โดยทำการศึกษาด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ ดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอ ไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization) (Wakabayashi, 1999) หลังจากนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายและการศึกษาเกี่ยวกับอณูชีววิทยาของแบคทีเรีย *F. columnare* มากขึ้นด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น multilocus sequence analysis (MLSA), internal spacer region-single strand conformation polymorphism analysis (ISR-SSCP) และ amplified fragment length polymorphism (AFLP) (LaFrentz et al., 2018) ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของแบคทีเรีย *F. columnare* แต่ละ genomovars ได้เพิ่มมากขึ้น จนในปัจจุบัน (พ.ศ.2562) แบคทีเรีย *F. columnare* ถูกแบ่งออกเป็น 6 genomovars ได้ แก่ genomovar I, genomovar II, genomovar II-A, genomovar II-B, genomovar III และ genomovar I/II (Garcia, LaFrentz, Waldbieser, Wong, & Chang, 2018; LaFrentz et al., 2017; LaFrentz, Waldbieser, Welch, & Shoemaker, 2014; Olivares et al., 2007) นอกจากนี้เมื่อมีการศึกษาเกี่ยวกับจีโนไทป์ของแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยเทคนิคที่มีความละเอียดขึ้นทำให้สามารถแยกความแตกต่างของจีโนไทป์เป็นกลุ่มต่าง ๆ ตาม genotypic group โดยแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยพบว่าแต่ละกลุ่มจะมีความจำเพาะต่อโฮสต์ (host) ที่แตกต่างกันไป (LaFrentz, Garcia, & Shelley, 2019; LaFrentz et al., 2018)

3. สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Flavobacterium columnare*

แบคทีเรีย *F. columnare* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสารอาหารปริมาณน้อย (low nutrient media) เช่น cytophaga medium, tryptone yeast extract salts (TYES) และ Anacker and Ordal's medium (AO) ที่อุณหภูมิ 15-25ºC เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งมีโคโลนีมีสีเหลือง ลักษณะเป็นเส้นใย (rhizoid) หากเลี้ยงในอาหารเหลวจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม รูปร่างเป็นแท่งเรียว ยาวประมาณ 3-10 ไมครอน กว้าง 0.3-0.5 ไมครอน (Cain & LaFrentz, 2007; Declercq, Haesebrouck, et al., 2013) คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แสดงในตาราง 1 (Pongnumpai & Chitmanat, 2017)

ตาราง 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare*

การทดสอบลักษณะ (characteristic test)	ผล
การผลิต:	
Cytochrome c oxidase	+
Catalase	+
Flexirubin-type pigment	+
Nitrate reduction	+
Congo red adsorption	+
Beta-galactosidase (ONPG)	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-
Lysine decarboxylase (LDC)	-
Ornithine decarboxylase (ODC)	-
Urease production (URE)	-
Tryptophane deaminase (TDA)	-
Indole (IND)	-

ตาราง 1 (ต่อ)

การทดสอบลักษณะ (characteristic test)	ผล
การผลิต:	
Voges Proskauer reaction (VP)	-
H_2S production	+
การผลิตกรดจาก:	
Glucose (GLU)	-
Mannitol (MAN)	-
Inositol (INO)	-
Lactose (LAC)	-
Sorbitol (SOR)	-
Rhamnose (RHA)	-
Sucrose (SAC)	-
Melibiose (MEL)	-
Mannose	-
Arabinose (ARA)	-
Amygdalin (AMY)	-
การย่อยสลายของ:	
Casein	+
Gelatine (GEL)	+
Starch	-

หมายเหตุ: (+) = ปฏิกิริยาเชิงบวก, (-) = ปฏิกิริยาเชิงลบ

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chiang Mai Veterinary Journal (2560) (Pongnumpai & Chitmanat, 2017)

โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein; OMP) ของแบคทีเรียแกรมลบเป็นโปรตีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี (Luo et al., 2016) มีบทบาทสำคัญในความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และแบคทีเรียที่เข้ายึดเกาะ (Kumar, Rathore, & El-Matbouli, 2014) โดยช่วยให้แบคทีเรียแกรมลบสามารถการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ (Hunter et al., 1986) นอกจากนี้โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ในการป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น (Huogeng, Chengzhu, & Changfu, 2010; Rahman et al., 2002; Xia, Wang, & Chen, 2007) โดยในปี พ.ศ. 2559 มีการนำเอาโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบไปพัฒนาเป็นวัคซีนในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลา (He et al., 2020; Luo et al., 2016; Xu et al., 2018) ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีประสิทธิภาพอย่างมากในการนำไปผลิตเป็นวัคซีนเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนที่ได้จากการทำให้เชื้อตายด้วยความร้อน และวัคซีนที่ได้จากการทำ formalin-fixed ปัจจุบันมีการนำโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ไปผลิตเป็นวัคซีนรวมไปถึงโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของ *Flavobacterium* spp. (Luo et al., 2016; Rahman et al., 2002), *Aeromonas* spp. (Abdelhamed, Ibrahim, Baumgartner, Lawrence, & Karsi, 2017; Diao et al., 2020; He et al., 2020) และ *Vibrio* spp. (Guo et al., 2020; Tang et al., 2017)

4. การระบาดของโรคคอลัมนาริส

แบคทีเรีย *F. columnare* กระจายอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วโลก พบว่ามีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในปลาน้ำจืดตามธรรมชาติและปลาที่เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น ปลาคาร์พ, ปลากดหลวง, ปลาทอง, ปลาหางนกยูง, ปลาไหล, ปลาเพริช, ปลาแซลมอน, ปลาเทราท์, ปลาม้าลาย, ปลากระโห้อินเดีย, ปลาชันฟิช, ปลากะพง และปลานิล (Decostere, Haesebrouck, & Devriese, 1998; Figueiredo et al., 2005; Loch & Faisal, 2015; Morley & Lewis, 2010; Sarker, Abraham, Banerjee, Adikesavalu, & Patra, 2017; Soto, Mauel, Karsi, & Lawrence, 2008; Suomalainen, Bandilla, & Valtonen, 2009) โดยพบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* มีการระบาดเป็นจำนวนมากในปลาน้ำจืดที่อยู่บริเวณเขตร้อน อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* ได้สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลากดหลวง (*Ictalurus punctatus*) ในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมากรองจากแบคทีเรีย *Edwardsiella ictalurid* ซึ่งส่งผลกระทบต่อ

เศรษฐกิจกว่าปีละ 30 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Hawke & Thune, 1992; Wagner, Wise, Khoo, & Terhune, 2002) สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ตลอดทั้งปี แต่จะพบการระบาดมากในช่วงที่มีสภาพอากาศ แปรปรวน โดยพบการระบาดในปลานิลที่เลี้ยงไว้ในบ่อดินและในกระชัง ช่วงเดือนสิงหาคม - ตุลาคม ปี พ.ศ. 2557 โดยมักพบการระบาดของโรคในระหว่างการขนย้ายปลา (Pongnumpai & Chitmanat, 2017)

นอกจากนี้แบคทีเรีย *F. columnare* ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น microbiota ของปลาในแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติและปลาที่เพาะเลี้ยงได้ โดยปลาที่มีสุขภาพแข็งแรงอาจมีแบคทีเรียนี้ติดอยู่ซึ่งได้รับจากการระบาดของโรคคอลัมนาริสก่อนหน้า ปลาดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นแหล่งเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายแบคทีเรีย *F. columnare* ให้กับปลาอื่น ๆ ที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน (Fujihara & Nakatani, 1971; Suomalainen, Tiirola, & Valtonen, 2005c) จากการศึกษาของ Fujihara และ Nakatani พบว่าปลาที่เป็นพาหะของโรคคอลัมนาริสสามารถแพร่กระจายแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ 5×10^3 cfu/mL ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง (Fujihara & Nakatani, 1971) โดยเหงือกปลาเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการแพร่กระจายโรค พบว่าปลาที่ตายแล้วสามารถแพร่กระจายโรคด้วยอัตราสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลามีชีวิต (Kunttu, Valtonen, Jokinen, & Suomalainen, 2009)

การระบาดของโรคคอลัมนาริสจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่ออยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งจากการทดลองนำแบคทีเรีย *F. columnare* ไปเลี้ยงในอุณหภูมิตั้งแต่ 12-20ºC พบว่าอัตราการเกิดโรคจะเพิ่มมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และยังพบว่าความสามารถในการยึดเกาะและความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้แบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ chondroitin AC lyase เพิ่มมากขึ้น โดยเอนไซม์ดังกล่าวของแบคทีเรียจะผลิตขึ้นสำหรับย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อช่วยในการยึดเกาะ ซึ่งที่ 23ºC เป็นอุณหภูมิที่มีอัตราการระบาดของโรคและอัตราการตายของปลาติดเชื้อเพิ่มขึ้นมากที่สุด (Suomalainen, Reunanen, Ijas, Valtonen, & Tiirola, 2006) และจากงานวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นศักยภาพของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่สามารถดำรงชีวิตรอดได้อย่างอิสระโดยไม่ต้องอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (free-living stages) เป็นระยะเวลานานในน้ำ การมีชีวิตรอดนั้นได้รับอิทธิพลจากลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำรอบ ๆ โดยแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ถึง 16 วันที่อุณหภูมิ 25ºC ในน้ำที่มีค่าอัลคาไลน์ที่มีความเป็นด่างสูง และมีอินทรีย์วัตถุปริมาณมาก (Fijan, 1969) การดำรงชีวิตรอดได้อย่างอิสระโดยไม่ต้องอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้แบคทีเรีย *F. columnare* สามารถเปลี่ยนรูปแบบความรุนแรงในการก่อโรคให้มีความรุนแรง

ลดลง นอกจากนี้ยังเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีซึ่งอาจช่วยในการประหยัดพลังงานในการดำรงชีวิต (Kunttu, Sundberg, Pulkkinen, & Valtonen, 2012)

5. อาการ รอยโรค และการเกิดโรคคอลัมนาริส

5.1 อาการ รอยโรค

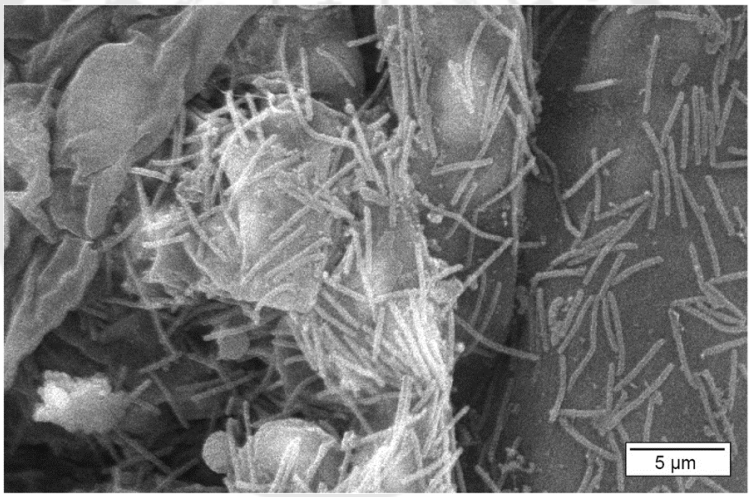
แบคทีเรีย *F. columnare* ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) และแบบเฉียบพลัน (acute infection) มักทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลเหลือง (yellowish-brown lesions) บริเวณเหงือก ผิวหนัง และครีบของปลาที่ติดเชื้อ (ภาพประกอบ 1) (Durborow, Thune, Hawke, & Camus, 1998) ซึ่งอาการของโรคคอลัมนาริสขึ้นอยู่กับความรุนแรงของสายพันธุ์แบคทีเรีย โดยการศึกษาของ Rucker และคณะ พบว่าสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่ำ (low virulence) นั้นจะทำให้เกิดการติดเชื้อแบบช้า ๆ ซึ่งจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อจำนวนมากก่อนที่ปลาจะตาย ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง (high virulence) ที่ติดเชื้อในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) จะเกิดการติดเชื้อที่รวดเร็ว รุนแรง และทำให้ปลาตาย ซึ่งสร้างความเสียหายภายใน 12-24 ชั่วโมง โดยปลาที่ติดเชื้อจะไม่มีการแสดงอาการ แต่จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเช่นกัน (Rucker, Earp, & Ordal, 1954) อย่างไรก็ตามความรุนแรงในการก่อโรคขึ้นอยู่กับอายุของปลาที่ติดเชื้อ โดยปลาวัยอ่อนมักจะเกิดโรคแบบเฉียบพลันทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็ว สำหรับปลาที่โตเต็มวัย อาจทำให้ปลาเป็นโรคทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน (subacute) และเรื้อรังส่งผลให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อโดยเฉพาะบริเวณเหงือก (Decostere, 2002; Pacha & Ordal, 1967)

ภาพประกอบ 1 ลักษณะของแผลที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* บริเวณเหงือกของปลาแซลมอน

ที่มา: Pacific region fish health program manager Andrew Goodwin US fish and wildlife service, (Andrew, 2019)

กรณีการติดเชื้อแบบเรื้อรังจะใช้ระยะเวลานานกว่า เหงือกของปลาที่ติดเชื้อจะแสดงให้เห็นถึงการถูกทำลายของเนื้อเยื่อ และแผลที่เกิดขึ้นบริเวณลำตัว (Decostere, 2002) โดยอาการเริ่มจากเกิดแผลบริเวณลำตัว สีซีดจาง เกิดรอยแดง ซึ่งส่วนใหญ่อาการเหล่านี้จะเริ่มเกิดจากส่วนของครีบหลัง (dorsal fin) จากนั้นรอยโรคจะเริ่มขยายออกจากครีบหลังไปยังส่วนอื่นของปลาเรียกว่า “saddle-back” ซึ่งโรคนี้ถูกเรียกอีกชื่อว่า “saddle back disease” สำหรับปลาที่ติดเชื้อบางตัวอาจแสดงอาการครีบเน่า (Finrot) (Bernardet & Bowman, 2006; Decostere & Haesebrouck, 1999) และอาจเกิดอาการอักเสบในบริเวณเยื่อบุช่องปาก (Bernardet & Bowman, 2006) โดยแผลที่เกิดในช่องปากทำให้ปลาติดเชื้อตายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่เกิดขึ้นบริเวณลำตัว หรือผิวหนัง เนื่องจากแผลในช่องปากทำให้ปลาไม่กินอาหาร และตายในที่สุด นอกจากนี้ยังทำให้ปลามีโอกาสติดเชื้อฉวยโอกาส (secondary infection) หรือเกิดการติดเชื้อร่วมกัน (co-infection) กับปรสิต เชื้อราหรือแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้ง่ายขึ้น (Ferguson, 2006) นอกจากนี้พบว่าการที่ผิวหนังและเหงือกของปลาติดเชื้อถูกทำลายทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าสู่ภายในร่างกายได้ โดยหลังจากการติดเชื้อหนึ่งวันจะเกิดการขยายตัวของเซลล์เหงือกที่ผิดปกติ

และมีการผลิตเมือกในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งการขยายตัวของเซลล์เหงือกส่งผลให้ซี่เหงือกติดกัน นำไปสู่การอุดตันทั่วทั้งเหงือกจนเกิดการสะสมของเลือดบริเวณเหงือก ทำให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว เหงือกบวม และเกิดการอักเสบอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งทำให้อัตราการตายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* อยู่ระหว่าง 10-100% อย่างไรก็ตามไม่พบการแสดงออกของรอยโรคบริเวณอวัยวะภายในของปลาติดเชื้อ แต่สามารถแยกเชื้อ *F. columnare* ได้จากอวัยวะภายในภายในของปลาโดยไม่มีการแสดงออกของโรค (Ferguson, 2006; Hawke & Thune, 1992) การรวมตัวของแบคทีเรีย *F. columnare* บริเวณผิวหนังและเหงือกมีลักษณะคล้ายกองฟาง (hay-stack-like) และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของปลาติดเชื้อมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopic: SEM) พบเซลล์แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดประมาณ 0.3-0.5 ไมครอน และยาว 3-10 ไมครอน ติดบริเวณเหงือกลักษณะรวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 เนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของปลาติดเชื้อ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบกราด แสดงให้เห็นรูปร่างของแบคทีเรีย *F. columnare*
ที่มา: (Declercq, Haesebrouck, et al., 2013)

5.2 การเกิดโรคคอลัมนาริส

จากการเหนี่ยวนำ (challenge) ให้เกิดโรคคอลัมนาริสในปลาคาร์พพบว่าปลาที่เป็นโรคมีการเปลี่ยนแปลงของเลือด โดยมีการลดลงของ packed cell volume (PCV) ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณเฉลี่ยของเซลล์กล้ามเนื้อ และจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว เกิดภาวะโซเดียมในเลือดต่ำ (hyponatremia) ภาวะคลอไรด์ในเลือดต่ำ (hypochloremia) และภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และเมื่อวิเคราะห์แร่ธาตุต่าง ๆ พบว่าระดับแคลเซียม (calcium) และแมกนีเซียม (magnesium) ลดลงเล็กน้อย แต่ค่า alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) และ creatine kinase (CK) มีการหลั่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Tripathi et al., 2005) แต่ในการศึกษาทางโลหิตวิทยาของปลาเทราท์ที่เป็นโรคคอลัมนาริสแบบเฉียบพลัน ซึ่งมีการระบาดของแบคทีเรีย *F. columnare* ในแหล่งน้ำธรรมชาติพบว่า ปลามีอาการของโรคโลหิตจาง (anemia) มีระดับโปรตีนในเลือดลดลง ฮีโมโกลบินสูงขึ้น ค่า blood urea nitrogen (BUN), AST, LDH และ ALP มีค่าลดลง และมีภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) (Rehulka & Minarik, 2007)

6. โฮสต์

แบคทีเรีย *F. columnare* มีการกระจายอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วโลก โดยพบว่าสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในปลาน้ำจืดตามธรรมชาติและปลาที่เพาะเลี้ยงหลายชนิดดังตาราง 2 ซึ่งส่วนมากจะพบในปลาชนิดต่าง ๆ ที่พบในบริเวณเขตร้อน (Decostere et al., 1998; Figueiredo et al., 2005; Loch & Faisal, 2015; Morley & Lewis, 2010; Sarker et al., 2017; Soto et al., 2008; Suomalainen et al., 2009)

ในประเทศไทยปลานิล (*Oreochromis* spp.) เป็นหนึ่งในโฮสต์ที่พบการระบาดและการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทั่วไปในบริเวณแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของประเทศ อาทิ จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดสมุทรสาคร จังหวัดสมุทรสงครามเป็นต้น ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากหากเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรงจะส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วทำให้ปลาในบ่อเลี้ยงตายภายใน 24-48 ชั่วโมง สาเหตุเกิดจากการที่แบคทีเรีย *F. columnare* เข้าไปอุดตันบริเวณช่องเหงือกทำให้ไม่สามารถแลกเปลี่ยนออกซิเจนได้ ทำให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลวและตายในที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในบ่ออนุบาลของลูกปลานิล แต่ในกรณีที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำจะทำให้เหงือก ครีบ และ

ผิวหนังของปลาถูกทำลาย เกิดเป็นบาดแผลบริเวณลำตัว ทำให้มูลค่าของปลาลดน้อยลง นอกจากนี้หากเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แล้วมีโอกาสสูงที่เชื้อดังกล่าวจะตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำได้ ซึ่งจากรายงานก่อนหน้าพบการติดเชื้อซ้ำของเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณเดิม และบริเวณอยู่เป็นประจำทุกปี (Pongnumpai & Chitmanat, 2017)

ตาราง 2 โฮสต์ของแบคทีเรีย *F. columnare*

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
ปลาหางนกยูง (black mollies)	*Poecilia reticulate*
ปลาเทราท์สีน้ำตาล (brown trout)	*Salmo trutta*
ปลากดหลวง (channel catfish)	*Ictalurus punctatus*
ปลาไหล (eel)	*Anguilla rostrate*
ปลาทอง (goldfish)	*Carassiusauratus*
ปลากระโห้อินเดีย (Indian carp)	*Catla catla*
ปลาคาร์พ (koi carp)	*Cyprinus carpio*
ปลาเพริช (perch fish)	*Perca* spp.
ปลาเทราท์สีรุ้ง (rainbow trout)	*Oncorhynchus mykiss*
ปลาแซลมอล (salmonid)	*Salmonidae* spp.
ปลากะพง sea bass	*Lates calcarifer*
ปลาซันฟิช (sunfish)	*Mola mola*
ปลานิล (tilapia)	*Oreochromis* spp.
ปลาม้าลาย (zebrafish)	*Danio rerio*

7. ปัจจัยในการเกิดโรคคอลัมนาริส

สภาพแวดล้อมส่งผลอย่างมากต่อการติดเชื้อและอัตราการตายของปลาที่เป็นโรคคอลัมนาริส พบว่าน้ำที่มีค่าอัลคาไลน์ซึ่งมีความเป็นด่างสูงและการมีปริมาณอินทรีย์วัตถุที่สูงภายในน้ำมีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *F. columnare* นอกจากนี้อุณหภูมิที่ 15-25°C ยังเป็นปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในน้ำได้นานขึ้น และปริมาณของแคลเซียมไอออน แมกนีเซียมไอออน โพแทสเซียมไอออน และโซเดียมไอออนมีความสำคัญต่อการอยู่รอดรวมถึงระยะเวลาในการอยู่รอด พบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* ที่อยู่ในน้ำที่มีสภาพเหมาะสมจะสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 5 เดือน อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *F. columnare* ไม่สามารถอยู่รอดได้ในน้ำที่มีความเป็นกรดสูง มีปริมาณอินทรีย์วัตถุต่ำ และมีแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบ (Kunttu et al., 2012)

ปลาที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ร่วมกับการติดปรสิตภายนอก (ectoparasites) จะเพิ่มประสิทธิภาพในการก่อโรคของแบคทีเรียส่งผลให้มีโอกาสเป็นโรคคอลัมนาริสสูงขึ้น และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว (Bandilla, Valtonen, Suomalainen, Aphalo, & Hakalahti, 2006) นอกจากนี้ความหนาแน่นของปลาในฟาร์มเลี้ยงเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่ออัตราการตาย และการระบาดของโรคคอลัมนาริส เนื่องจากเมื่อมีการเลี้ยงปลาที่มีความหนาแน่นสูงจะทำให้แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อัตราการตายของปลาในฟาร์มสูงขึ้น สำหรับการไหลของน้ำเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดโรค โดยฟาร์มที่เลี้ยงปลาในบ่อที่มีระบบน้ำไหลเวียนจะมีอัตราการตายลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับฟาร์มที่เลี้ยงปลาในบ่อที่เป็นน้ำนิ่ง เนื่องจากในน้ำที่ไหลจะลดระยะเวลาในการสัมผัส และลดโอกาสในการสัมผัสกันระหว่างแบคทีเรียในน้ำกับเนื้อเยื่อของปลาในบ่อเลี้ยง (Suomalainen et al., 2006)

8. กลไกการเกิดโรคคอลัมนาริส

แบคทีเรียก่อโรคมีกลไกในการก่อโรคในโฮสต์ได้หลายทาง แต่การสัมผัสโดยตรงกับโฮสต์และการเกาะติดกับเนื้อเยื่อของโฮสต์เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการก่อโรค โดยภายหลังจากการเกาะติดอยู่กับโฮสต์ แบคทีเรียจะใช้ประโยชน์จากโฮสต์เพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวน และพยายามในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ซึ่งแบคทีเรียที่มีความรุนแรงในการก่อโรคจะย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อเข้าสู่ภายใน นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังมีการผลิตเอนไซม์และสารพิษที่ก่อให้เกิดโรค ดังนั้นจึงมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรค อย่างไรก็ตามความรุนแรงในการก่อโรคอาจได้รับ

ปัจจัยมาจากโฮสต์เอง เช่น อายุและชนิดของโฮสต์ จากการทดลองพบว่าในปลาที่อายุน้อย จะสามารถชักนำให้เกิดโรคคอลัมนาริสได้ง่ายกว่าปลาที่โตเต็มวัยซึ่งมีความทนต่อโรคสูงกว่า นอกจากนี้ยังมีปลาบางชนิดที่ไวต่อการติดเชื้อตามธรรมชาติ และปลาบางชนิดมีความอ่อนไหวในการชักนำให้เกิดโรคระดับปานกลาง โดยความแตกต่างในการทนต่อโรคของปลาแต่ละชนิดอาจเกิดจากลักษณะของเกล็ดและผิวหนังที่ต่างกัน และจากการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *F. columnare* พบว่าปลาแต่ละชนิดจะติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความรุนแรงในการก่อโรคต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามมีการสันนิษฐานว่าการระบาดเป็นครั้งคราวของโรคคอลัมนาริสตามธรรมชาตินั้นมีแบคทีเรีย *F. columnare* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงเกี่ยวข้อง (Declercq, Haesebrouck, et al., 2013)

8.1 **การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย** (colonization)

กลไกการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อของโฮสต์นั้นเป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนเป็นอย่างมากซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนได้แก่ การสัมผัส (attraction) การยึดเกาะ (adhesion) และ การรวมกลุ่ม (aggregation) ซึ่งในปัจจุบันกลไกการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย *F. columnare* ยังไม่มีข้อมูลมากเท่าที่ควร

การศึกษาของ Klesius และคณะ แสดงให้เห็นว่าเมือกบริเวณผิวหนังและเหงือกของปลาชักนำให้เกิดการเคลื่อนที่เข้าหาของแบคทีเรีย *F. columnare* (Klesius, Shoemaker, & Evans, 2008) โดยแบคทีเรียใน genomovar II ซึ่งมีความรุนแรงในการก่อโรคจะตอบสนองได้ดีต่อสารชักนำ (chemotactic factor) ที่ได้รับ ทำให้ทราบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าหาโฮสต์ของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย (LaFrentz & Klesius, 2009) และจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียในอาหารเหลวพบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถเคลื่อนที่แนวราบในทิศทางไปข้างหน้า (forward) และถอยหลัง (backward) ได้ โดยพบว่าตำแหน่งโครงสร้างของ fibrillar ที่ตั้งอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และชั้นของ mucopeptide อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย นอกจากนี้พบว่าการเคลื่อนเข้าหาโฮสต์ของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับตัวรับ (carbohydrate-binding receptor) ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งจะจับกับคาร์โบไฮเดรต 3 ตัวได้แก่ D-mannose, D-glucose และ N-acetyl D-glucosamine เมื่อทดลองกระตุ้นด้วย D-mannose พบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* ไม่มีการเคลื่อนไหวและไม่มีการตอบสนองของยีน *gldH* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเคลื่อนไหวในแบคทีเรีย (Klesius, Pridgeon, & Aksoy, 2010)

ความสามารถในการยึดเกาะเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียบริเวณเนื้อเยื่อของโฮสต์ โดยเมื่อนำแบคทีเรีย *F. columnare* ที่มีความบกพร่องในการยึดเกาะมาชักนำให้เกิดโรคในปลาพบว่าการตายของปลาลดลง 75% เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ไม่มีความบกพร่องในการยึดเกาะ (Bader, Shoemaker, & Klesius, 2005) จากการศึกษาของ Decostere และคณะพบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงมีความสามารถในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (Decostere, Haesebrouck, Van Driessche, Charlier, & Ducatelle, 1999) ซึ่งจากการแยกแบคทีเรีย *F. columnare* genomovar I และ genomovar II จากปลาที่เป็นโรค แบคทีเรียทั้งสอง genomovars แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างในเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (cumulative percent mortalities: CPM) โดยแบคทีเรีย genomovar II กระตุ้นให้เปอร์เซ็นต์การตายสะสมสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (LaFrentz, LaPatra, Shoemaker, & Klesius, 2012) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรีย *F. columnare* genomovar I และ genomovar II พบว่าที่ 30 นาทีหลังจากการชักนำให้เกิดโรค แบคทีเรียทั้งสองสามารถยึดเกาะกับเหงือกของปลาได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน แต่พบความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดถึงความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียทั้งสองเมื่อเวลามากขึ้น โดยแบคทีเรีย *F. columnare* genomovar II มีความสามารถในการยึดเกาะได้ดีกว่าแบคทีเรีย *F. columnare* genomovar I (Klesius et al., 2008) นอกจากนี้ความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่ก่อโรครุนแรงจะมีโคโลนีเจริญเป็นร่างแห (rhizoid colony) ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรีย (Kunttu, Suomalainen , Jokinen, & Valtonen, 2009)

แบคทีเรีย *F. columnare* มีการผลิตเมือก 2 ชนิด โดยชนิดแรกคือ acidic polysaccharide ซึ่งเป็นกรดที่สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีแดงรูทีเนียม (ruthenium red) สำหรับเมือกอีกชนิดหนึ่งคือ acetylated polygalactosamine ซึ่งไม่สามารถย้อมได้ด้วยสีแดงรูทีเนียม และยังพบว่าแคปซูลของแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถย้อมได้ด้วยสีแดงรูทีเนียม เนื่องจากบริเวณแคปซูลอาจมี acidic polysaccharide เป็นองค์ประกอบซึ่ง acidic polysaccharide อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยึดเกาะ การศึกษาของ Decostere และคณะ แสดงให้เห็นว่าในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงความสามารถในการยึดเกาะจะลดลงเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย sodium metaperiodate หรือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่มี D-glucose, N-acetyl D-glucosamine, D-galactose และ D-sucrose เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้

ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงจะมีแคปซูลที่หนาและมีความหนาแน่นสูง เมื่อเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรง คาดว่าโครงสร้างเลคติด (lectin) อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อ (Decostere, Haesebrouck, Van Driessche, et al., 1999) สภาพแวดล้อมเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการยึดเกาะ ซึ่งในน้ำที่มีอินทรียวัตถุและไนไตรต์ปริมาณสูง ส่งผลให้แบคทีเรีย *F. columnare* สามารถยึดเกาะได้ดีขึ้น นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการยึดเกาะที่ดีขึ้น (Decostere, Haesebrouck, Turnbull, & Charlier, 1999; Kunttu, Jokinen, Valtonen, & Sundber, 2011) อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มมากขึ้นความสามารถในการยึดเกาะจะลดลง (Altinok & Grizzle, 2001)

การรวมกลุ่มของแบคทีเรีย *F. columnare* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงบนเนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อมีลักษณะของรูปแบบในการรวมกลุ่มที่ชัดเจน ส่งผลให้เหงือกถูกปกคลุมด้วยกลุ่มของแบคทีเรียจำนวนมาก และแบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างไบโอฟิล์มกีดขวางการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของปลาทำให้ปลาตายในที่สุด ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงจะไม่พบการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งความสามารถในการรวมกลุ่มของแบคทีเรียอาจเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคคอลัมนาริสขึ้น (Staroscik & Nelson, 2008) การพัฒนาตัวเองของแบคทีเรียเพื่อเข้าสู่ระยะที่สร้างไบโอฟิล์ม (biofilm state) ถูกควบคุมด้วยกระบวนการ quorum sensing (QS) ซึ่งเป็นกลไกควบคุมการแสดงออกของยีน *luxI* ในแบคทีเรียแกรมลบเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยสัญญาณทางเคมีจากแบคทีเรียที่อยู่โดยรอบ แบคทีเรีย *F. columnare* จะมีการผลิต N-acylhomoserine lactone synthase เพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิต N-acylhomoserine lactone (AHL) (Romero, Avendano-Herrera, Magarinos, Camara, & Otero, 2010) และ autoinducer-2 (AI-2) (Camilli & Bassler, 2006) สำหรับใช้เป็นสัญญาณในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่ง Wagner-Dobler และคณะพบว่าในแบคทีเรีย *F. columnare* ที่เข้าสู่ระยะที่สร้างไบโอฟิล์มจะพบการทำงานของ AHL (Wagner-Dobler et al., 2005)

8.2 การเกิดท็อกซิน (toxin)

กระบวนการย่อยสลาย polysaccharide ร่วมกับการหลั่งเอนไซม์ (extracellular enzyme) ทำให้เกิดการทำลายผิวหนัง กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อ ช่วยเพิ่มโอกาสในการเกิดโรค โดยแบคทีเรีย *F. columnare* มีการผลิตเอนไซม์ chondroitin AC lyase ที่ย่อยสลาย chondroitin sulfates A และ C และย่อยสลาย hyaluronic acid ซึ่งเป็น polysaccharides ที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เอนไซม์ chondroitin AC

lyase ทำหน้าที่ในการย่อยสลายอย่างจำเพาะต่อ polysaccharides ในกลุ่ม acidic mucopolysaccharides ที่เป็นกรดซึ่งพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์เป็นหลัก (Dalsgaard, 1993) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งกำเนิดของโฮสต์ การกระจายทางภูมิศาสตร์ และปริมาณในการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Griffin, 1991) แต่เอนไซม์ chondroitin AC lyase อาจมีบทบาทเกี่ยวกับความรุนแรงในการก่อโรคของแบคทีเรีย (Kunttu et al., 2011) นอกจากนี้เอนไซม์ proteases มีส่วนที่ทำให้เกิดการเสียหายของเนื้อเยื่อและยังส่งเสริมกระบวนการรุกรานของแบคทีเรียอีกด้วย (Dalsgaard, 1993) จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ proteases ของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่แยกได้จากปลาติดเชื้อและตรวจสอบด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์ proteases มีขนาดประมาณ 44.5-59.5 กิโลดอลตัน (kDa) มีคุณสมบัติในการย่อยสลาย เจลาติน (gelatin) เคซิน (casein) และ อีลาสติน (elastin) โดยแบคทีเรีย *F. columnare* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่มีสารอาหารและเกลือต่ำจะมีการผลิตเอนไซม์ proteases ปริมาณมากเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่มีสารอาหารและเกลือสูง นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตเอนไซม์ proteases ของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง (Newton, Wood, & Hartley, 1997)

แบคทีเรีย *F. columnare* ไม่เพียงสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายเนื้อเยื่อของโฮสต์ซึ่งทำให้เกิดแผลเท่านั้นแต่ยังมีการผลิตสารจำพวก bacteriocins ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นและทำให้แบคทีเรียอื่นไม่สามารถแพร่กระจายได้ เพื่อลดการแข่งขันกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น โดยพบว่า bacteriocins ที่ผลิตขึ้นไม่มีผลต่อเซลล์ของแบคทีเรีย *F. columnare* เองเนื่องจากไม่มีตัวรับที่จำเพาะต่อ bacteriocins นั้น (Anacker & Ordal, 1959)

8.3 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

เมื่อเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียขึ้นปลาจะมีการตอบสนองด้วยระบบภูมิคุ้มแบบไม่จำเพาะ (innate immune) โดยชั้นเมือกที่ผิวของปลาเป็นการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียขั้นแรกด้วยวิธีทางกายภาพ ซึ่งมีหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของแบคทีเรีย กระบวนการดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาต่อแบคทีเรีย (Olivares-Fuster, Bullard, McElwain, Llosa, & Arias, 2011) เมือกที่ปลาผลิตขึ้นนั้นสามารถลดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียตายได้ (Tripathi et al., 2005) อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Staroscik และ Nelson แสดงให้เห็นผลที่ต่างออกไปโดยในแบคทีเรีย *F. columnare* สายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงพบว่าเมือกที่ปลาผลิตขึ้นนั้นกระตุ้นให้แบคทีเรียเจริญและ

พัฒนาเพื่อเข้าสู่ระยะที่สร้างไบโอฟิล์ม นอกจากนี้ยังพบว่าเมือกปลาสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ proteases ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเมือกบริเวณผิวของปลาแต่ละชนิดมีผลต่อการตอบสนองของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่แตกต่างกันออกไป (Staroscik & Nelson, 2008)

ผิวหนังของปลาคือการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่ง พบว่าในปลาไหลที่ถูกชักนำให้เกิดโรคคอลัมนาริส มีการตอบสนองด้วยการผลิต cathepsins B และ cathepsins L มากขึ้น 1.5 เท่าเมื่อเทียบกับปลาไหลที่ไม่เป็นโรค ซึ่ง cathepsins ที่ผลิตขึ้นมีส่วนช่วยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *F. columnare* บริเวณผิวของปลาไหล การตอบสนองดังกล่าวเป็นรูปแบบหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาไหล (Aranishi, Mano, Nakane, & Hirose, 1998)

อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* มีความสามารถในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาได้ โดยพบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* มีการผลิตกรด sialic เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคอีกหลายชนิด ซึ่งกรด sialic จะยับยั้ง alternative complement pathway (ACP) ของปลาส่งผลให้ไม่เกิดการสร้าง bacteriocins แบคทีเรียจึงสามารถเจริญได้ (Ourth & Bachinski, 1987) คุณสมบัติอีกประการของแบคทีเรีย *F. columnare* ในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาคือแบคทีเรีย *F. columnare* จะไม่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบในปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเซลล์บริเวณที่ติดเชื้อแบคทีเรียจะถูกยับยั้งไม่ให้เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ซึ่งเกิดจากการหลั่งสารบางชนิดของแบคทีเรียเพื่อทำลายสัญญาณทางเคมี (chemical signal) ของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ทำให้เซลล์ไม่เกิดกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) (Sun et al., 2012; Vale, Marques, & Silva, 2003) นอกจากนี้จากการศึกษาการปลูกภูมิคุ้มกันในปลาพบว่า ปลาที่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) ต่อแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถตอบสนองต่อการติดเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้ปลาไม่เป็นโรคคอลัมนาริส (Bebak, Matthews, & Shoemaker, 2009; Grabowski, LaPatra, & Cain, 2004)

9. การตรวจวินิจฉัยโรคคอลัมนาริส

การตรวจหาสารก่อโรค ตัวบ่งชี้ หรือแบคทีเรียก่อโรคในเวลาที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายและเพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลา โดยในปัจจุบันสามารถตรวจหาสารก่อโรค ตัวบ่งชี้ หรือแบคทีเรียก่อโรคได้หลายวิธีด้วยกันดังนี้

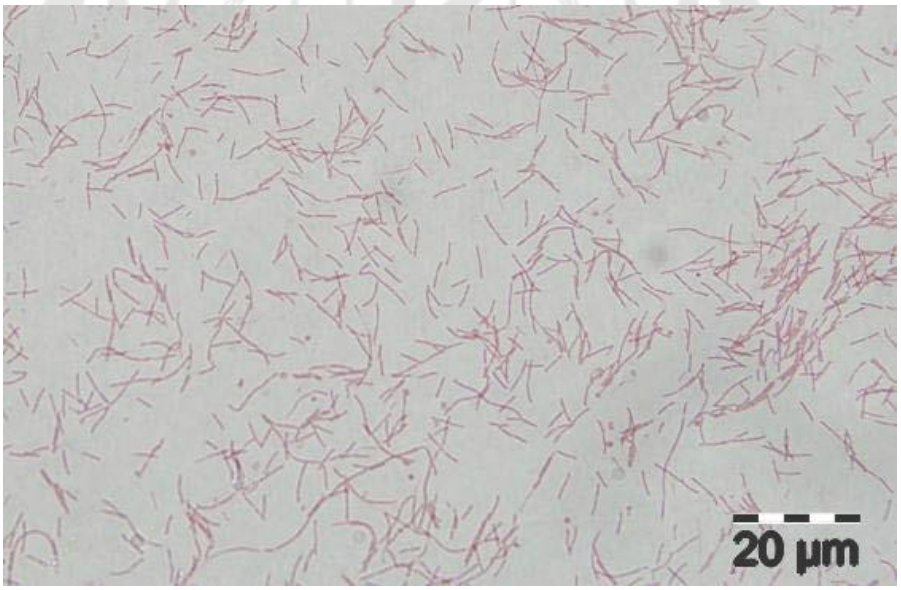
9.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

การสุ่มตรวจโรคปลาสำหรับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อช่วยในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค และลดความเสียหายทางเศรษฐกิจแก่เกษตรกร ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรีย *F. columnare* จากแผลภายนอก (external lesions) ของปลาที่ติดเชื้อ โดยแบคทีเรีย *F. columnare* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสารอาหารปริมาณน้อย แต่ไม่เจริญบนอาหาร trypticase soy agar (TSA) และ nutrient agar หรือ Marine 2216 agar (Bernardet & Bowman, 2006) ในปี พ.ศ. 2487 สามารถเลี้ยงแบคทีเรีย *F. columnare* ที่แยกได้จากปลาติดเชื้อเป็นครั้งแรกบน cytophaga agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีสารอาหารปริมาณน้อย ทำให้ในเวลาต่อมาอาหารเลี้ยงแบคทีเรียหลายชนิดถูกพัฒนาขึ้นเช่น Shieh และ TYES ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2523 และปี พ.ศ. 2530 ตามลำดับ (Holt, 1987; Shieh, 1980) เพื่อปรับปรุงการเจริญของแบคทีเรีย ต่อมามีการพัฒนาอาหารจำเพาะ (selective media) โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันในการต้านยาปฏิชีวนะ เช่น polymyxin และ neomycin มาคัดแยกแบคทีเรีย *F. columnare* ออกจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดอื่น (Bernardet & Grimont, 1989; Bullock, 1986; Fijan, 1969) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มากกว่า 5% (w/v) และมีค่า pH ต่ำกว่า 6 โดยจะเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-30ºC แต่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25ºC ใช้เวลาในการเจริญ 24-72 ชั่วโมง (Cain & LaFrentz, 2007; Declercq, Haesebrouck, et al., 2013; Lafrentz, Goodwin, et al., 2012)

9.2 การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางจุลชีววิทยา

แบคทีเรีย *F. columnare* มีโคโลนีสีเหลืองเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง (solid media) มีรูปแบบโคโลนี 2 รูปแบบคือ โคโลนีเรียบ (smooth colony) และโคโลนีเจริญเป็นร่างแห (rhizoid colony) (Bader et al., 2005) ต่อมาในปี พ.ศ. 2554 Kunttu และคณะ พบรูปแบบโคโลนีที่แตกต่างไปจาก 2 รูปแบบแรกโดยมีลักษณะขรุขระ (rough colony) โดยได้อธิบายความแตกต่างของ 3 รูปแบบไว้ว่าโคโลนีเจริญเป็นร่างแห เป็นรูปแบบโคโลนีที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง

(virulent) และมีความสามารถในการยึดเกาะระดับปานกลาง (moderately adherent) สำหรับโคโลนีที่ไม่สร้างร่างแหหรือโคโลนีแบบขรุขระ เป็นรูปแบบโคโลนีที่ก่อโรคไม่รุนแรง (non-virulent) แต่มีความสามารถในการยึดเกาะสูง (highly adherent) และโคโลนีเรียบ เป็นรูปแบบโคโลนีที่ก่อโรคไม่รุนแรงและมีความสามารถในการยึดเกาะต่ำ (poorly adherent) (Kunttu et al., 2011) โคโลนีของแบคทีเรีย *F. columnare* บางครั้งสามารถยึดเกาะได้แน่นบนอาหารแข็ง และเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว (broth media) พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นใยสีเหลืองอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์ และสามารถสร้างวงแหวนหนาบริเวณพื้นผิวของภาชนะ โดยความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียจะหายไปเมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร (subcultures) หลายครั้ง สำหรับสีเหลืองที่เป็นเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย *F. columnare* นั้นเกิดจากการผลิต flexirubin pigments (Bernardet & Bowman, 2006; Decostere et al., 1998) และเมื่อนำมาย้อมด้วยสีย้อมแกรมพบว่าแบคทีเรีย *F. columnare* ติดสีย้อมทับ (counter stain) ของ safranin มองเห็นเป็นสีแดง (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 ลักษณะของ แบคทีเรีย *F. columnare* ที่เลี้ยงใน TYES broth ซึ่งย้อมด้วยสีย้อมแกรม

ที่มา: (Cain & LaFrentz, 2007)

9.3 การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

ในปี พ.ศ. 2539 ได้มีรายงานการจำแนกสายพันธุ์ของ Flavobacterium โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของโปรตีนและกรดไขมัน (Bernardet et al., 1996) ด้วยการใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ *Hae III* ตัดแบ่ง *16S rDNA* ของแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งใช้ universal primer ของ 20F และ 1500R ในการเพิ่มจำนวน ทำให้สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 genomovars คือ genomovar I, genomovar II และ genomovar III ตามความรุนแรงของการก่อโรค (Wakabayashi, 1999) และเมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RFLP กับ single strand conformation polymorphism (SSCP) พบว่าในการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรีย *F. columnare* เทคนิค SSCP มีความละเอียดในการจำแนกสายพันธุ์มากกว่าเทคนิค RFLP (Olivares et al., 2007) อย่างไรก็ตามการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธีการที่มีความละเอียดในการจำแนกมากขึ้นเช่น multilocus sequence analysis (MLSA), intergenic spacer region single strand conformation polymorphism (ISR-SSCP) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรีย *F. columnare* แต่ละ genomovars ได้เพิ่มมากขึ้น (Garcia et al., 2018; LaFrentz et al., 2017; LaFrentz et al., 2014) และสำหรับการตรวจทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพื่อใช้จำแนกแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งนิยมใช้*16S rRNA* ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (species-specific primers) เช่น คู่ไพรเมอร์ของ Darwish และคณะ (ColF และ ColR) ที่ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 675 bp (Darwish, Ismaiel, Newton, & Tang, 2004) และคู่ไพรเมอร์ของ Welker และคณะ (FCISRFL และ FCISRR1) ที่ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 550 bp มีความไวที่ 7×10^{1} cfu/mL (Welker, Shoemaker, Arias, & Klesius, 2005) นอกจากนี้มีการพัฒนาเทคนิค PCR ที่จำเพาะต่อยีน chondroitin AC lyase (*cslA*) ของแบคทีเรีย *F. columnare* โดยใช้ Fcol-F และ Fcol-R เป็นไพรเมอร์ ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 287 bp (Mabrok et al., 2020) อย่างไรก็ตามการตรวจทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี PCR ยังคงได้รับการพัฒนาเรื่อยมาเพื่อใช้ในการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย *F. columnare* โดยในปี 2562 ได้มีการพัฒนา multiplex PCR ขึ้นเพื่อจำแนกแบคทีเรีย *F. columnare* ตาม genetic group ออกเป็น 4 groups ซึ่งใช้ไพรเมอร์พร้อมกัน 4 คู่ภายใต้สภาวะเดียวกัน ให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 320, 415, 659 และ 894 bp (LaFrentz et al., 2019) โดยวิธีนี้สามารถใช้จำแนกแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในระยะเวลาไม่นาน และช่วยลดความยุ่งยากในการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ซึ่งบางครั้งอาจจะไม่สามารถสรุปผลได้ชัดเจน (Darwish et al., 2004)

นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อใช้สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ในอวัยวะของปลาติดเชื้อ (เหงือก ผิวหนัง และ ไต) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ 161F3 และ 161B3 เป็น ไพรเมอร์คู่นอก และใช้ 161FIP และ 161BIP เป็นไพรเมอร์คู่ใน ทำปฏิกิริยาที่ 65ºC เป็นเวลา 60 นาที (Yeh, Shoemaker, & Klesius, 2006) ซึ่งเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูงและมีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10-100 เท่า ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค TaqMan-based real-time PCR โดยเพิ่มจำนวนยีน *cslA* ของแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์มีขนาด 113 bp ทำให้สามารถใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจสอบเชิงปริมาณ (quantitation) ของแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อเหงือก ไต และเลือดของปลาที่ติดเชื้อ (Panangala, Shoemaker, & Klesius, 2007) และสำหรับเทคนิค Length heterogeneity PCR (LH-PCR) เป็นการเปรียบเทียบความยาวที่แตกต่างกันของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *16S rDNA* ระหว่างกลุ่มของแบคทีเรีย โดยเทคนิค LH-PCR เป็นอีกเทคนิคที่สามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อของปลาที่ติดเชื้อ (Suomalainen, Tiirola, & Valtonen, 2005a; Suzuki, Rappe, & Giovannoni, 1998)

9.4 การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา

การตรวจวินิจฉัยโรคคอลัมนาริสด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาสามารถทำได้ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay โดยการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมของปลาที่ติดเชื้อ โดยใช้แบคทีเรีย *F. columnare* ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator เคลือบ ELISA microtiter plate และทำการบ่มด้วยซีรัมของปลาที่ต้องการตรวจ จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่ 1 ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีของปลา และเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งติดอยู่กับเอนไซม์ ในกรณีที่ปลามีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* เมื่อผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase จะปรากฏให้เห็นเป็นสีเหลือง ในทางตรงกันข้ามหากปลาไม่มีสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย (Grabowski et al., 2004; Shoemaker, Shelby, & Klesius, 2003) นอกจากนี้ยังมีวิธี fluorescent antibody test โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากแพะที่ถูกปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแบคทีเรีย *F. columnare* เป็นแอนติบอดีตัวที่ 1 และใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของแพะซึ่งติดอยู่กับ Alexa fluor 594 เป็นแอนติบอดีตัวที่ 2 กรณีตรวจพบแบคทีเรีย *F. columnare* จะเกิดการเรืองแสงสีแดง (Panangala et al., 2006; Speare, Markham, Despres, Whitman, &

MacNair, 1995) ซึ่งทั้งสองวิธีได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพและมีความรวดเร็วในการตรวจวินิจฉัยโรคคอลัมนาริส

10. การป้องกันและรักษาโรคคอลัมนาริส

กระบวนการจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงของเกษตรกรที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการในการป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคคอลัมนาริสที่เกิดจากแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ดีที่สุด โดยเริ่มจากการคัดเลือกลูกพันธุ์ปลาที่มีคุณภาพจากแหล่งที่น่าเชื่อถือและผ่านการตรวจสอบโรคแล้วนั้นเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญสำหรับการป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคนี้ นอกจากนี้ปัจจัยในด้านสภาพแวดล้อม เช่น ความลึกของบ่อเลี้ยง ความหนาแน่นในการเลี้ยง อาหารและปริมาณแอมโมเนียในบ่อเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดและการระบาดของโรค (Cunningham, Jack, Hardin, & Wills, 2012) โดยจากการศึกษาพบว่าการบำบัดน้ำด้วยโอโซนสามารถลดปริมาณของแบคทีเรีย *F. columnare* ในบ่อเลี้ยงได้ (Conrad, Holt, & Kreps, 1975) นอกจากนี้การแช่อุปกรณ์ที่ใช้ภายในบ่อเลี้ยงด้วยน้ำที่มีสภาพเป็นกรด หรือในน้ำที่มีสภาพความเค็มสูงสามารถกำจัดแบคทีเรีย *F. columnare* และเป็นวิธีลดการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Suomalainen et al., 2005c) สำหรับปัจจัยด้านความหนาแน่นของปลาในบ่อเลี้ยงนั้นมีรายงานว่า การลดความหนาแน่นของปลาในบ่อเลี้ยงสามารถป้องกันการเกิดโรคได้ เนื่องจากภายในบ่อที่มีความหนาแน่นของปลาสูงจะมีโอกาสในการติดปรสิตทั้งที่เป็นปรสิตภายนอกและปรสิตภายในซึ่งเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาอ่อนแอและติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น (Suomalainen, Tiirola, & Valtonen, 2005b) นอกจากนี้ปริมาณของอินทรียวัตถุที่สูงจะส่งเสริมความสามารถในการยึดเกาะกับโฮสต์ของแบคทีเรีย *F. columnare* จึงจำเป็นต้องควบคุมและจัดการกับคุณภาพน้ำภายในบ่อเลี้ยง และควรบำบัดน้ำก่อนการปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อป้องกันการเกิดและการระบาดของโรค (Decostere, Haesebrouck, Turnbull, et al., 1999)

10.1 การป้องกันโรคคอลัมนาริส

สำหรับการป้องกันโรคจากการทดลองชักนำให้เกิดโรคคอลัมนาริสในปลาด้วยการแช่ (immersion challenge) พบว่าอัตราการตายของปลาลดลงเมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้น และไม่พบการตายของปลาที่ถูกชักนำให้เกิดโรคคอลัมนาริสเมื่อเลี้ยงปลาในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 3-9% (w/v) เนื่องจากแบคทีเรีย *F. columnare* ไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 1% (w/v) ขึ้นไป (Altinok & Grizzle, 2001) จากการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปปรับใช้ใน

ฟาร์มเพื่อป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคคอลัมนาริสได้ นอกจากนี้การแช่ปลาในสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate: $CuSO_4$) ความเข้มข้น 37 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำลงบ่อเลี้ยงสามารถป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริสได้ และการเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Darwish, Mitchell, & Straus, 2012; Davis, 1922) หรือสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate: $KMnO_4$) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (Darwish, Mitchell, & Straus, 2009) ลงในบ่อเลี้ยงสามารถป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริสได้เช่นกัน และยังพบว่าการใช้ chloramine-T ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถช่วยลดอัตราการตายของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* จาก 84-100% เป็น 6-14% (Riley, 2000) จากการศึกษาของ Thomas-Jinu และ Goodwin ที่ใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline เพื่อป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริส พบว่ายาปฏิชีวนะ oxytetracycline มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคโคลัมนาริส (Thomas & Goodwin, 2004) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า 11% ของแบคทีเรีย *F. columnare* ดื้อยาปฏิชีวนะ oxytetracycline และยังพบว่ามากกว่า 10% ของแบคทีเรีย *F. columnare* ดื้อยาปฏิชีวนะ enrofloxacin (Declercq, Boyen, et al., 2013)

การให้วัคซีนปลายังเป็นอีกวิธีในการป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริสที่มีประสิทธิภาพและยังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ เนื่องจากพบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนจะมีการตายลดลงเมื่อเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน (Moore, Eimers, & Cardella, 1990) แต่ยังคงติดปัญหาในเรื่องของต้นทุนเนื่องจากการให้วัคซีนปลาที่เลี้ยงทุกตัวมีค่าใช้จ่ายสูง ส่งผลให้ต้นในการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย (Pongnumpai & Chitmanat, 2017) สำหรับการพัฒนาวัคซีนในระยะแรกจะใช้แบคทีเรียที่เตรียมจากแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ทำให้ตายด้วยฟอร์มาลิน (formalin killed) หรือเตรียมจากแบคทีเรียที่อ่อนกำลังลง เรียกว่าแบคทีริน (bacterin) และทำการปลูกภูมิคุ้มกันในปลาด้วยการฉีดแบคทีเรียที่ตายแล้วผสมกับแอนจูแวนท์ (adjuvant) เข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) ซึ่งจะทำให้ปลาสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* โดยพบว่าเมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์หลังปลูกภูมิคุ้มกันปลามีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น (Grabowski et al., 2004) แต่การศึกษาของ Bader และคณะชี้ให้เห็นว่าฟอร์มาลินทำให้แอนติเจนบางส่วนเสียสภาพ ส่งผลให้ประสิทธิภาพของวัคซีนลดลง (Bader, Klesius, & Vinitnantharat, 1997) ทำให้มีการพัฒนายาไรแฟมพิซิน (rifampicin) ซึ่งสามารถทำให้แบคทีเรียอ่อนกำลังลงเพื่อนำไปพัฒนาเป็นวัคซีน ในปี พ.ศ. 2554 มีการขึ้นทะเบียนวัคซีนซึ่งผลิตจากแบคทีเรียที่อ่อนแรงของแบคทีเรีย *F. columnare* โดยเป็นวัคซีนแบบแช่ (attenuated immersion vaccine) เพื่อใช้ในการป้องกันการเกิดโรคคอลัม

นาริสในปลากดหลวง พบว่าการให้วัคซีนดังกล่าวแก่ลูกปลาที่ฟักออกจากไข่ได้ 10-48 วัน ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (relative percent survival) ภายหลังการชักนำให้เกิดโรคอยู่ที่ระหว่าง 57-94% (Shoemaker, Klesius, Drennan, & Evans, 2011) สำหรับการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคคอลัมนาริสในปลานิลของประเทศไทย ปัจจุบันมีการใช้น้อยมากเนื่องจากยังไม่เห็นผลต่างที่ชัดเจนของปลานิลที่ได้รับวัคซีนกับปลานิลที่ไม่ได้รับวัคซีน ซึ่งความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *F. columnare* ทำให้ยากในการพัฒนาวัคซีนที่สามารถใช้ได้ครอบคลุมทุกพื้นที่ของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Declercq, Haesebrouck, et al., 2013) และจากการทดลองให้วัคซีนป้องกันโรคคอลัมนาริสร่วมกับโรคเอ็ดเวิร์ด (Edwardsiellosis) แก่ไข่ในระยะที่ใกล้ฟักตัว (eyed-egg stage) ด้วยวิธีการแช่ พบว่าสามารถป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริสและโรคเอ็ดเวิร์ด นอกจากนี้มีการทดลองให้วัคซีนป้องกันโรคคอลัมนาริสที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคการห่อหุ้มแบคทีเรียที่ตายแล้วด้วยโพลิเมอร์กับปลาวัยอ่อนด้วยวิธีการแช่ พบว่าสามารถป้องการเกิดโรคคอลัมนาริสได้เช่นกัน โดยวิธีการดังกล่าวมีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำวัยอ่อนและเป็นวิธีการที่สามารถนำไปใช้ได้จริงในเชิงอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากไม่ต้องจับปลามาให้วัคซีนแต่ละตัว (Kitiyodom et al., 2019; Shoemaker, Klesius, & Evans, 2007) ทั้งนี้พบว่าส่วนของโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน (antigenicity) สูงจึงเป็นส่วนที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นวัคซีน (Luo et al., 2016)

การให้อาหารเสริมภูมิคุ้มกันเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการป้องกันการเกิดโรคคอลัมนาริส ซึ่งในอาหารเสริมภูมิคุ้มกันมีการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotic) และจุลินทรีย์พรีไบโอติก (prebiotic) เพื่อช่วยในการป้องกันโรคที่เกิดในสัตว์น้ำหลายชนิด (Merrifield et al., 2010) ซึ่งจากการศึกษาของ Boutin และคณะ ที่แยกแบคทีเรียไม่ก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ จากผิวหนังปลาเทราท์ (*Salvelinus fontinalis*) พบว่าแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *F. columnare* (Boutin, Bernatchez, Audet, & Derome, 2012) อีกทั้งการใช้อาหารเสริมภูมิคุ้มกันที่มีเซลล์ยีสต์เป็นส่วนประกอบร่วมกับผลผลิตที่เกิดจากการหมักของเชื้อรา สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลา และอาหารที่มีส่วนประกอบของบีตา-กลูแคน (β-glucan) และบีตา-ไฮดรอกซิล-บีตา-เมทธิลบูไทเลท (β-hydroxy-β-methylbutyrate) ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา แต่พบว่าไม่สามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของปลาที่ถูกชักนำให้เกิดโรคคอลัมนาริส (Kunttu, Valtonen, et al., 2009; Zhao et al., 2015)

10.2 การรักษาโรคคอลัมนาริส

การรักษาโรคคอลัมนาริสด้วยสารเคมีและยาปฏิชีวนะให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาภายนอก (external treatments) จะได้ผลในระยะแรกของการเกิดโรค (Bullock, 1986) ซึ่งยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสำหรับการรักษาด้วยการแช่ได้แก่ chloramphenicol, nifurpirinol, nifurprazine และ oxolinic acid สำหรับยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพเมื่อนำไปผสมกับอาหารคือ oxytetracycline โดยผสมในอาหารและให้ปลากินติดต่อกันเป็นระยะเวลา 10 วัน จะสามารถรักษาโรคคอลัมนาริสในช่วงแรกของการระบาดได้ (Declercq, Haesebrouck, et al., 2013) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าในการใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ผสมในอาหารบางครั้งไม่ประสบผลสำเร็จ (Koski & Bernardet, 1993) อาจเนื่องจากปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* มีการแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงจนเข้าสู่ระยะที่ปลาไม่กินอาหาร นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม sulfonamides เช่น sulfamerazine และ sulfamethazine สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคคอลัมนาริสด้วยวิธีผสมในอาหาร แต่ประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้จะต่ำกว่า oxytetracycline (Bullock, 1986)

การศึกษาของ Gaunt และคณะชี้ให้เห็นว่าการใช้ florfenicol ผสมในอาหาร โดยจะให้ในอัตราส่วน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 10 วัน จะสามารถรักษาโรคคอลัมนาริสได้ และ florfenicol ยังสามารถใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และ *F. columnare* ได้อีกด้วย (Gaunt, Gao, Sun, & Endris, 2010) แต่การใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้แบคทีเรีย *F. columnare* ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Shoemaker et al., 2011) รวมทั้งอาจส่งผลให้ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้ภายหลังจากการรับประทานปลา เนื่องจากการมียาปฏิชีวนะตกค้างในปลา และยังก่อให้เกิดความเสี่ยงในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่ดื้อยาปฏิชีวนะไปสู่แบคทีเรียในมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (Serrano, 2005) นอกจากการใช้ยาปฏิชีวนะแล้วพบว่ายังมีการใช้สารกำจัดวัชพืชไดควอท (diquat) คอปเปอร์ซัลเฟต รวมไปถึงโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต เพื่อลดการตายของปลาเนื่องจากการเกิดโรคคอลัมนาริส (Darwish et al., 2009, 2012; Thomas & Goodwin, 2004) และมีการใช้แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) ในการควบคุมแบคทีเรียเพื่อป้องกันโรคระบาดเนื่องจากแบคทีเรียในสัตว์น้ำ โดยพบว่าแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. phage lysates สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *F. columnare* และ *F. columnare* phage FCP1 สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการรักษาโรคคอลัมนาริสได้ (Laanto, Sundberg, & Bamford, 2011; Prasad, Kumar, & Sharma, 2011) ซึ่งวิธีการนี้อาจเป็นแนวทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากเป็น

การรักษาที่ลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมี อย่างไรก็ตามควรมีการคัดกรองแบคเทอริโอเฟจที่ใช้โดยไม่ให้มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะหรือยีนสร้างสารพิษในแบคเทอริโอเฟจ เพื่อลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

11. โมโนโคลนอลแอนติบอดี

ในงานวิจัยนี้จะเป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody: MAb) เพื่อใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ที่เป็นสาเหตุของโรคคอลัมนาริสในปลาน้ำจืด ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่ออิพิโทป (epitope) ของแอนติเจน (antigen) เพียงอิพิโทปเดียว โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลั่งจากเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่เกิดจากการหลอมรวมกันของเซลล์มะเร็งหรือเซลล์ไมอิโลมา (myeloma cell) กับเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด B (B cell) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน ทั้งการใช้เป็นตัวตรวจสอบด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่าง ๆ การตรวจวินิจฉัยโรค การใช้แอนติบอดีในการรักษาโรค (immunotherapy) การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการศึกษาวิจัยเป็นต้น เนื่องจากมีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนแอนติเจนทำให้สามารถใช้พิสูจน์ทราบ วัดปริมาณ ตรวจหาตำแหน่งของโมเลกุล เซลล์ ไวรัสหรือแบคทีเรียต่าง ๆ ได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ โดยเทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Köhler และ Milstein ในปี 1976 ซึ่งจากผลงานดังกล่าวทำให้ทั้งสองท่านได้รับรางวัลโนเบลสาขาการแพทย์ในปี 1984

11.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นทำได้โดยฉีดแอนติเจนที่สนใจในหนู จากนั้นนำลิมโฟซัยท์ชนิด B จากม้ามของหนูที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจน มาผสมกับเซลล์ไมอิโลมา (malignant B cell) ที่มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวได้ไม่จำกัด นำเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาหลอมรวมกันได้เซลล์ใหม่เรียกว่า เซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งมีคุณสมบัติของเซลล์ไมอิโลมาคือสามารถแบ่งตัวและเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีวันตาย และมีคุณสมบัติของเซลล์ม้าม ทำให้เซลล์ไฮบริโดมาสามารถหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเดียวของแอนติเจนซึ่งเรียกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี การหลอมรวมเซลล์ไมอิโลมากับลิมโฟซัยท์ชนิด B ทำได้โดยการใช้พอลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) โดยทั่วไปไม่สามารถหลอมรวมเซลล์ได้ทั้งหมด จะพบมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีเซลล์ไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ โดยทั่วไปการใช้เซลล์ไมอิโลมาที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่

เกี่ยวกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใน salvage pathway ทำให้ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงใน HAT medium เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่หลอมรวมกับลิมโฟซัยท์ชนิด B หรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ มีเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่างเซลล์ไมอิโลมากับลิมโฟซัยท์ชนิด B เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จากลิมโฟซัยท์ชนิด B ส่วนลิมโฟซัยท์ชนิด B ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้นๆ และตายไปในที่สุด (Köhler & Milstein, 1975; ไพศาล, 2005)

การผลิตเซลล์ไฮบริโดมานั้นจะใช้เซลล์ไมอิโลมาที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกัน คือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HGPRT (HGPRT-) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลิน (Ig-) จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ เนื่องจากมีเซลล์ไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่หนู วิธีที่นิยมใช้ในการคัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting, dot blotting, immunohistochemistry และการทดสอบทางภูมิคุ้มกันรูปแบบอื่น ๆ เมื่อคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์เดียว จากนั้นขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล, 2005)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นนั้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์หลาย ๆ ด้านโดยเฉพาะในด้านการตรวจวินิจฉัยโรค โดยมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวแม่นยำสูง และใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่าวิธีการที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ และยังมีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในงานด้านการแพทย์เช่น การวินิจฉัยการตั้งครรภ์ การวัดปริมาณยาในเลือดของผู้ป่วย การตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และการตรวจหาแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด นอกจากนี้ยังมีการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือเพื่อตรวจโรคจากแบคทีเรียและไวรัสในสัตว์น้ำ (ไพศาล, 2005)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลองและแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

1. หนูขาว (Swiss mice) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา

2. ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) จากตลาดปลาสวยงามจตุจักร กรุงเทพฯ

3. แบคทีเรีย ไอโซเลตต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แบคทีเรียที่ใช้ในการเตรียมแอนติเจนและใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction)

No.	Bacterial isolates	Code	Host	Institute
1.	*Flavobacterium columnare*	1301	Nile tilapia	CPF
2.	*F. columnare*	AT	Nile tilapia	CPF
3.	*F. columnare*	AT1703	red tilapia	CUVET
4.	*F. columnare*	CC1802	red tilapia	CUVET
5.	*F. columnare*	CC1805	red tilapia	CUVET
6.	*F. columnare*	CN1808	seabass	CUVET
7.	*F. columnare*	1213	red tilapia	CUVET
8.	*F. columnare*	1349	red tilapia	CUVET
9.	*F. columnare*	1350	red tilapia	CUVET
10.	*Flavobacterium* spp.	VN	Nile tilapia	CPF
11.	*F. indicum*	1225	koi carp	CUVET
12.	*Chryseobacterium massiliae*	1205	Nile tilapia	CUVET
13.	*C. taichungense*	1217	red tilapia	CUVET

ตาราง 3 (ต่อ)

No.	Bacterial isolates	Code	Host	Institute
14.	*C. indologenes*	1219	red tilapia	CUVET
15.	*C. indologenes*	25-2	fairy shrimp	DBSWU
16.	*Flectobacillus roseus*	1207	Nile tilapia	CUVET
17.	*Aeromonas hydrophila*	22097	unknown	DMST
18.	*Edwardsiella tarda*	B52808	unknown	UK
19.	*Vibrio parahaemolyticus*	23798	stool	DMST
20.	*V. harveyi*	1C	bloody clam	DBSWU
21.	*V. campbellii*	VH-Surat	*P. monodon*	CENTEX
22.	*V. vulnificus*	0011	fish	PSU
23.	*V. alginolyticus*	24048	water	DMST
24.	*Pseudomonas damska*	-	unknown	-
25.	*P. aeruginosa*	11-12610	unknown	DBSWU
26.	*Salmonella* Hadar	581104	food	KMP
27.	*Shigella flexneri*	-	unknown	DMSM
48.	*Escherichia coli*	25922	unknown	ATCC
29	*Streptococcus agalactiae*	CU65	unknown	CPF
30.	*S. aureus*	25923	unknown	ATCC

หมายเหตุ: ATCC = The American Type Culture Collection, CPF = Charoen Pokphand Food Public Co., Ltd., CUVET = Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Chulalongkorn University, CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, DBSWU = Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot

University, DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand, DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, KMP = Biotech Co., Ltd., PSU = Prince of Songkhla University, UK = United Kingdom

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 4 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้งานวิจัย	บริษัท
1. กล้อง Inverted microscope รุ่น IX70	Olympus, U.S.A.
2. กล้อง Compound microscope	Olympus, U.S.A.
3. เครื่องชั่งสาร รุ่น A200	Sartorius, Germany
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge)	Spectrafuge, Korea
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	Eppendorf, Germany
6. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E	Scientific industries
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Jenway6400	Bausch & Lomb, U.S.A.
8. เครื่อง Thermo iEMS Microplate Reader	Thermo scientific
9. เครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer	Thermo scientific
10. เครื่อง thermal cycler	Eppendorf, Germany
11. เครื่อง sonicator	LABQUIP
12. เครื่อง electrophoresis apparatus และอุปกรณ์	Bio-Rad, U.S.A.
13. เครื่อง Nucleic Acid Electrophoresis	Bio-Rad, U.S.A.
14. ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad, U.S.A.
15. ชุด transblot apparatus	Bio-Rad, U.S.A.

ตาราง **4 (**ต่อ**)**

อุปกรณ์ที่ใช้งานวิจัย	บริษัท
16. ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (5% CO_2 incubator)	NUAIRE, U.S.A.
17. ตู้ปลอดเชื้อสำหรับทำ culture (horizontal laminar flow cabinet)	NUAIRE, U.S.A.

3. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตาราง 5 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1.ยาปฏิชีวนะ (Ampicillin และ Streptomycin)	Sigma, U.S.A.
2. Fetal bovine serum	Sigma, U.S.A.
3. Polyethylene glycol (PEG)	Sigma, U.S.A.
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma, U.S.A.
5. Hypoxanthine	Gibco, U.S.A.
6. Nitrocellulose membrane	Sigma, U.S.A.
7. ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed, U.S.A.
8. Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad, U.S.A.
9. D-glucose	Gibco, U.S.A.
10. L-glutamine	Gibco, U.S.A.
11. Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$)	Sigma, U.S.A.
12. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	Amresco, U.S.A.
13. HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)	Amresco, U.S.A.
14. HT supplement	Gibco, U.S.A.

ตาราง 5 (ต่อ)

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
15. Acrylamide	Bio-Rad, U.S.A.
16. Bis (N, N'-methylene-bis-acrylamide)	Bio-Rad, U.S.A.
17. Tris (hydroxyethyl) aminomethane	Bio-Rad, U.S.A.
18. SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Bio-Rad, U.S.A.
19. SDS molecular weight markers	Sigma, U.S.A.
20. Ammonium persulfate	Bio-Rad, U.S.A.
21. ชุดทดสอบ Hybridoma sub-isotype, mouse	Zymed, U.S.A.
22. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	Gibco, U.S.A.

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare*

นำแบคทีเรียสกุล *Flavobacterium* ดังตาราง 3 มาตรวจวิเคราะห์ยีนยันชนิดของแบคทีเรีย โดยการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะต่อยีน chondroitin AC lyase (*cslA*) (Mabrok et al., 2020) ซึ่งมีขั้นตอนในการศึกษาดังนี้

4.1.1 การสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียสกุล *Flavobacterium* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ cytophaga broth บ่มที่อุณหภูมิ 24ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรียด้วยชุด G-spin™ Total DNA extraction Kit โดยมีขั้นตอนในการสกัดดังนี้นำแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ cytophaga broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) ที่ 12,000 × g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนใส (supernatant) ทิ้ง จากนั้นเติม CL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 56ºC เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเติม BL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 70ºC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 × g เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงปริมาตร 400 ไมโครลิตรใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม absolute ethanol (EtOH) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ใน spin column และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 × g เป็นเวลา 1 นาที เติม WA buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 × g เป็นเวลา 1 นาที เติม WB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับการเติม WA buffer เมื่อครบกำหนดทำการเติม CE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 × g เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อเก็บกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากแบคทีเรีย วัดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop™ Lite Spectrophotometer และปรับความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกที่ได้ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70ºC

4.1.2 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากแบคทีเรียจากข้อ 4.1.1 มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ชุด PCRBIO HS Taq DNA Polymerase ซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายต่าง ๆ ดังตาราง 6 จากนั้นนำหลอด thin wall ที่ผสมสารละลายแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler กำหนดอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาตามตาราง 7 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.0% agarose gel ให้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 70 นาที และตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ภายใต้แสง ultraviolet (UV) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับทดสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 287 bp

ไพรเมอร์สำหรับทดสอบแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

Forward primer: FcoI_F 5’-AATGACTTCAACTAGAACAGTAGGTGCTGA-3’

Reverse primer: FcoI_R 5’-CTTGTTTATCATAGATCATAGCTGATGCTCC-3’

ตาราง 6 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนผสม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
กรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดแบคทีเรีย (50ng/µl)	2
5X PCRBIO reaction buffer	5
Forward primer (10µM): FcoI_F	1
Reverse primer (10µM): FcoI_R	1
PCRBIO HS Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0.5
PCR grade dH_2O	15.5
ปริมาตรสุทธิ	25

ตาราง 7 ขั้นตอน อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (ºC)	ระยะเวลา	หมายเหตุ
1. initial denaturation	94	5 นาที	
2. denaturation	94	45 วินาที	ทำซ้ำขั้นที่ (2) - (4)
3. annealing	60	45 วินาที	เป็นจำนวน 30 รอบ
4. extension	72	30 วินาที	
5. hold	4	∞	

4.2 การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

4.2.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ที่ผ่านการยืนยันชนิดของแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มาเลี้ยงบนอาหาร cytophaga agar โดยวิธี simple streak บ่มที่อุณหภูมิ 24ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพิ่มจำนวน single colony ใน cytophaga broth ที่อุณหภูมิ 24ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4300 × g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.15 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 จำนวน 2 รอบ นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ส่วนหนึ่งมาแขวนลอยในสารละลาย PBS และทำการปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้อยู่ในช่วง 10^9 cfu/mL โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 525 nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 1.0 จากนั้นนำไปฆ่าด้วยความร้อน (heat killed) ที่อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนด แบ่งเก็บเป็นส่วนๆ ทำการตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate บนอาหาร cytophaga agar และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20ºC สำหรับใช้ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting สำหรับตะกอนเซลล์แบคทีเรียอีกส่วนนำมาแขวนลอยในสารละลาย 20 mM Tris-HCl pH7.5 ปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้เท่ากับ 10^9 cfu/mL จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้ไปสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein; OMP) ตามวิธีของ Luo และ Rahman (Luo et al., 2016; Rahman et al., 2002)

4.2.2 การสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

นำแบคทีเรีย *F. columnare* ได้จากขั้นตอนข้อ 4.2.1 มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นเติม sodium lauroyl sarcosinate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2% และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 4300 × g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 20 นาที นำ supernatant ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 35,000 × g อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาแขวนลอยในสารละลาย PBS pH7.5 หาความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) จากนั้นแบ่งสารละลายโปรตีนเป็นส่วนๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20ºC โดยส่วนหนึ่งใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

4.2.3 การปลูกภูมิคุ้มกัน

นำแอนติเจนในรูปแบบ OMP ของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ได้จากการสกัดเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitonium) ของหนูขาวเพศเมียอายุประมาณ 6 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำด้วยแอนติเจนเดิมโดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง ภายหลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำการเก็บเลือดบริเวณหัวตา (orbital sinus) ของหนูขาวทั้ง 4 ตัว จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 × g เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อแยกแอนติซีรัม (antiserum) แล้วนำไปทดสอบการตอบสนองและความจำเพาะด้วยวิธี Western blotting เพื่อคัดเลือกหนูขาวที่มีการตอบสนองดีที่สุดต่อแบคทีเรีย *F. columnare*

4.2.4 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting

นำแอนติเจนรูปแบบ OMP และรูปแบบ heat killed ของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301, *F. indicum* และ *A. hydrophila* มาทำการแยกโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์เป็นเวลา 130 นาที แล้วนำเจลที่ได้มาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ Transblot apparatus ด้วยกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำ nitrocellulose membrane ที่ผ่านการถ่ายโปรตีนจากเจลแล้ว บ่มใน 5% blotto (นมปราศจากมันเนย 5% ละลายใน PBS, 0.1% Triton X-100) เป็นเวลา 15 นาที และบ่มด้วยแอนติซีรัมของหนูขาวแต่ละตัวเจือจาง 1:5,000 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำมาบ่มด้วย horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM–HRP) ที่เจือจาง 1:2,500 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase โดยแช่ในสารละลายซับสเตรทที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05% cobalt chloride ($CoCl_2$) ละลายใน PBS เป็นเวลา 2 นาที และนำไปล้างด้วยน้ำประปาเพื่อหยุดปฏิกิริยา ตรวจสอบตำแหน่งของโปรตีนโดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

4.3 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

นำหนูขาวที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย OMP ของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 5:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 3 วัน ก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา เมื่อครบกำหนดทำการผ่าตัดเพื่อแยกม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวจากนั้นหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) ที่มีความเข้มข้น 50% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 แล้วบ่มที่ 37ºC ในตู้ CO_2 incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ 1,500 × g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงใน selective HAT medium ประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal bovine serum ใน RPMI medium โดยมี feeder layer เป็น 1% mouse red blood cell และบ่มไว้ในตู้ CO_2 incubator ที่สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 7 วัน ติดตามการเติบโตของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope เมื่อครบ 7 วันนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่าง ๆที่มีเซลล์ไฮบริโดมาไปคัดเลือกเซลล์ที่

สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting สำหรับโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแบคทีเรีย *F. columnare* นำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์เดียว จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ให้ได้ในปริมาณตามที่ต้องการและเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -196°C

4.4 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* นั้น เนื่องจากการผลิตเซลล์ไฮบริโดมามีการเลี้ยงใน 96 wells microculture plate ทำให้ได้เซลล์ไฮบริโดมาจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องทำการคัดเลือกโดยมีขั้นตอนในการคัดเลือก 3 ขั้นตอนคือ ทำการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting ในขั้นที่ 1 มาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และนำน้ำเลี้ยงเซลล์ของโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับทั้ง 2 ขั้นตอนก่อนหน้ามาคัดเลือกอีกครั้งด้วยวิธี immunohistochemistry

4.4.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 ด้วยวิธี dot blotting

นำแบคทีเรีย *F. columnare* และแบคทีเรีย *F. indicum* ในรูปแบบ heat killed ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL หยดลงบน nitrocellulose membrane ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.3 × 0.3 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มด้วย 5% blotto เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์จากเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุม (น้ำเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:10 ใน 1% blotto) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำมาบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:2,500 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนก่อนหน้า (ข้อ 4.2.4) แล้วล้างด้วยน้ำประปาเพื่อหยุดปฏิกิริยา เลือกหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ซึ่งปรากฏจุดสีดำบน nitrocellulose membrane แต่ไม่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. indicum* จากนั้นนำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี dot blotting และ Western blotting

4.4.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting

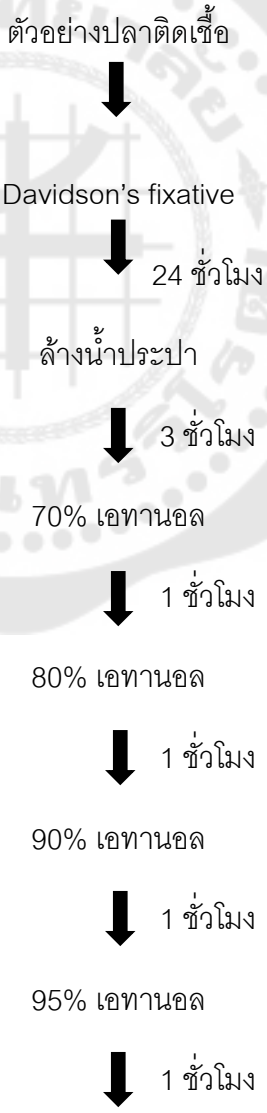
วิธี dot blotting ในการคัดเลือกขั้นที่ 2 นี้คล้ายคลึงกับในขั้นตอนที่ 1 โดยใช้แบคทีเรีย *F. columnare* แบคทีเรีย *F. indicum* ในรูปแบบ heat killed ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL และแบคทีเรีย Flavobacterium ไอโซเลตอื่นเพิ่มเติมจากการคัดเลือกขั้นที่ 1 (ตาราง 3) มาหยดลงบน nitrocellulose membrane ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.3 × 0.3 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร บ่มด้วย 5% blotto และบ่มด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 4.2.4 เลือกหลุมของเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 และ *F. columnare* ทุกไอโซเลต

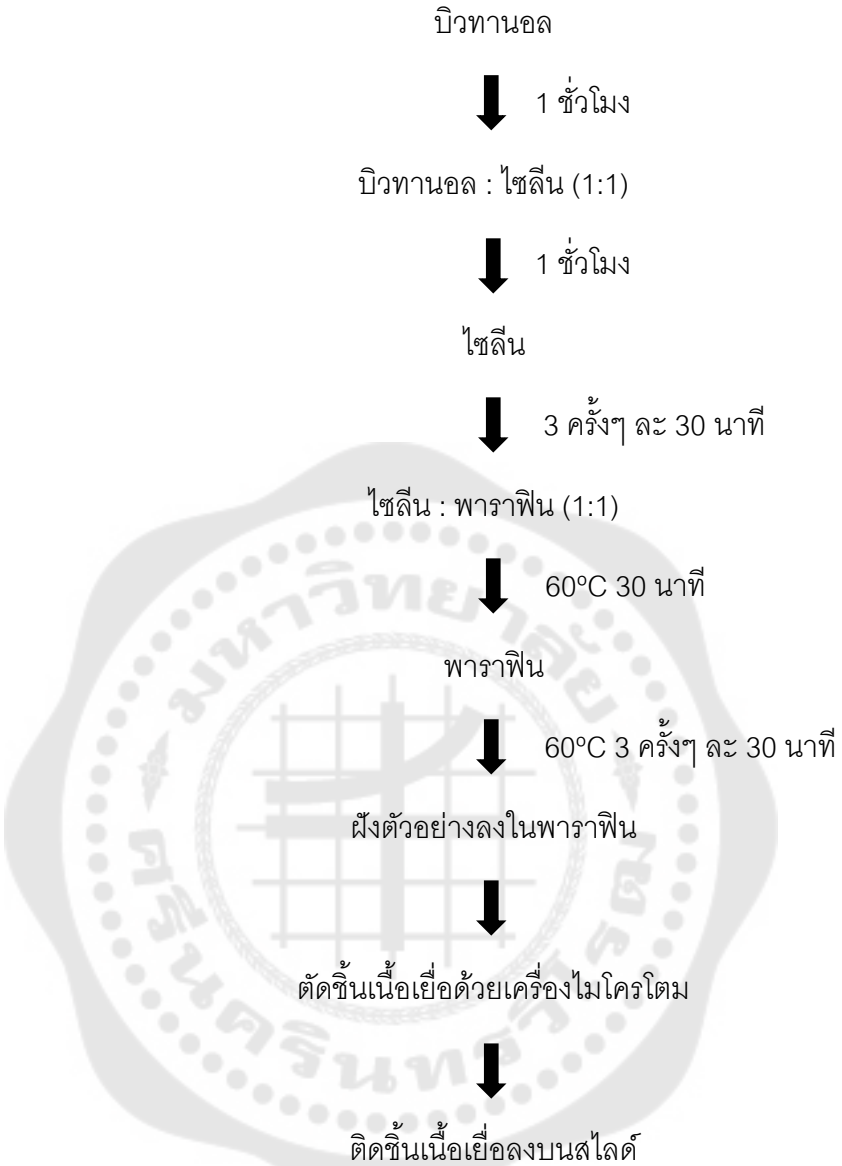
วิธี Western blotting นำแบคทีเรีย *F. columnare* ในรูปแบบ heat killed ความเข้มข้น 2 × 10^8 cfu/mL มาทำการแยกโปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดยให้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์เป็นเวลา 130 นาที แล้วนำเจลที่ได้มาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่ nitrocellulose membrane โดยใช้ Transblot apparatus ด้วยกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำ nitrocellulose membrane ที่ผ่านการถ่ายโปรตีนจากเจลแล้ว บ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 15 นาที แยกบ่มในน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจางที่ความเข้มข้น 1:10 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 4.2.4 เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี

4.4.3 การคัดเลือกขั้นที่ 3 ด้วยวิธี immunohistochemistry

นำตัวอย่างปลาที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* มาทำให้คงรูปในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างเอาน้ำยาคงรูปออก นำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ (70%, 80%, 90% และ 95%) บิวทานอล และไซลีน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 4) นำตัวอย่างปลาฝังในพาราฟิน แล้วตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้แต่ละชิ้นมีความหนาประมาณ 8 ไมครอน จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน ตั้งบน hot plate ที่อุณหภูมิ 50ºC ให้ชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดยืดตัว หลังจากนั้นอบสไลด์ให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างพาราฟินออกด้วยไซลีนและบิวทานอล เติมน้ำเข้าชิ้นเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ (95%, 90%, 80% และ 70%) แล้วทำการตรึงชิ้นเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ล้างด้วยน้ำกลั่น และ PBS จากนั้นทำการหยดสารละลาย P_1^+ (10% fetal bovine serum) ลงบนตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา

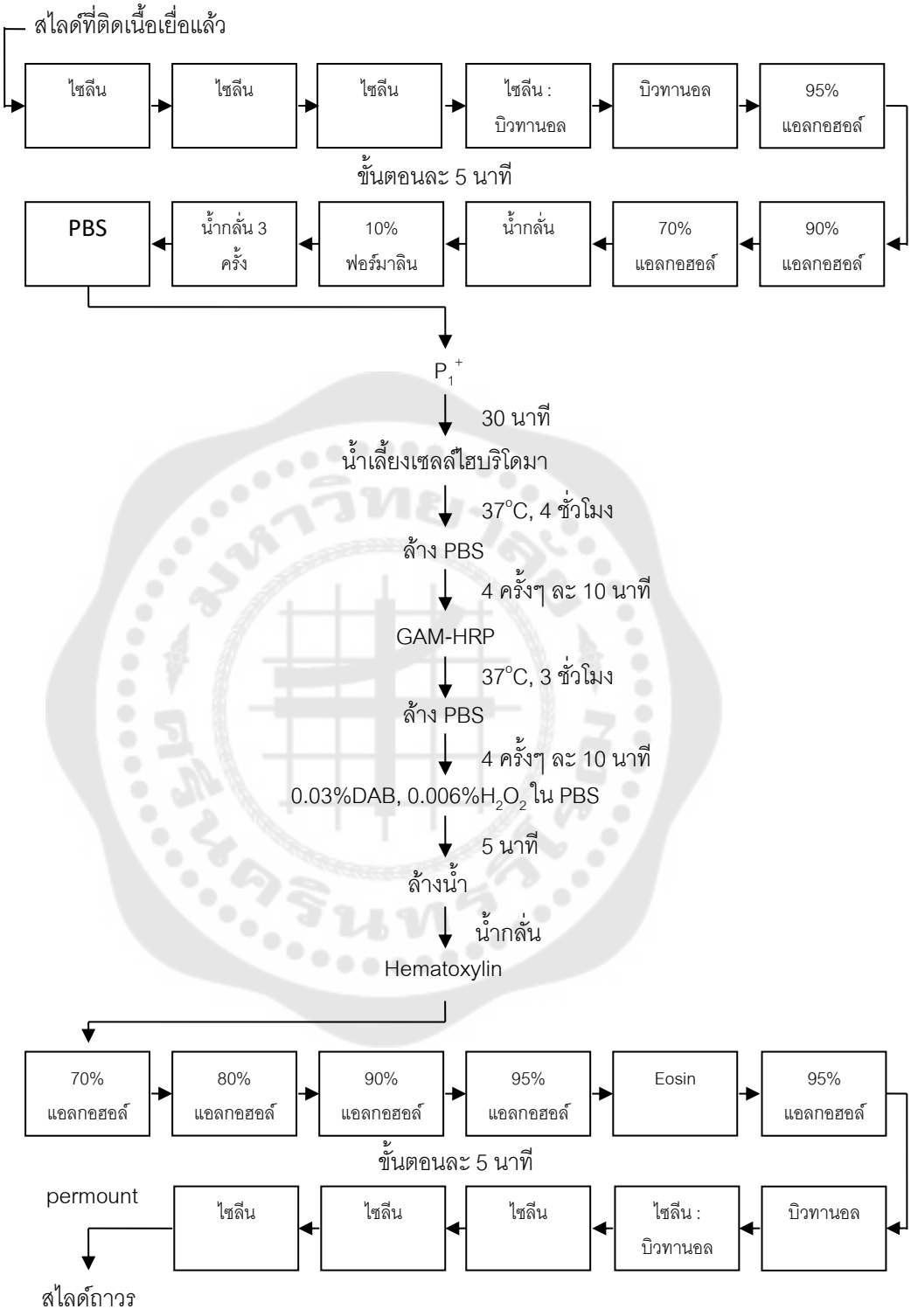
30 นาที นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที หยด GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 ในสารละลาย P_1^+ บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS แช่ในสารละลายซับสเตรทที่ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide (H_2O_2) ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ล้างชิ้นเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น และนำไปย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลิน (haematoxylin) แล้วไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ และย้อมชิ้นเนื้อเยื่อด้วยสีอีโอซิน (eosin Y) ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95% แอลกอฮอล์ บิวทานอล และทำให้เนื้อเยื่อใสด้วยไซลีน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตัวอย่างที่ให้บวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 5)





ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิธี immunohistochemistry

ที่มา: ดัดแปลงจาก (ไพศาล, 2005)



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการย้อมสีด้วยวิธี immunohistochemistry

ที่มา: ดัดแปลงจาก (ไพศาล, 2005)

4.4.4 การโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution

หลังการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting วิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry เมื่อพบกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ต้องการแล้ว นำกลุ่มเซลล์ไฮบริโดมามาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution โดยนำเซลล์ไฮบริโดมามากระจายในหลุมโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายและหยดเซลล์แขวนลอยลงในจานเลี้ยงเชื้อ 1-2 ไมโครลิตร ทำการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 100 เซลล์ จากนั้นเติม RPMI medium ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum, 1% mouse red blood cell ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน 96 wells microculture plate บ่มไว้ในตู้ CO_2 incubator ที่สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10-12 วัน ตรวจสอบหลุมที่มีโคลนเดี่ยว (single colony) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี dot blotting จากนั้นทำการขยายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา

4.4.5 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมา

เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาให้เจริญอยู่ใน RPMI medium ที่เสริมด้วย 20% fetal bovine serum กระจายและดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอด ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 1,500 × g เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนใสออกจากเซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นเติมสารละลาย 12% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide: DMSO) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับเซลล์ไฮบริโดมา ดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดสำหรับเก็บเซลล์ (cryopreservation tube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -196ºC

4.5 การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ภายหลังจากการโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution และขยายเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติ โดยทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตต่าง ๆ และแบคทีเรียอื่น ๆที่มีความใกล้ชิด และ/หรือเป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลาด้วยวิธี dot blotting ทำการตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้กับแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตต่าง ๆ ด้วยวิธี dot blotting

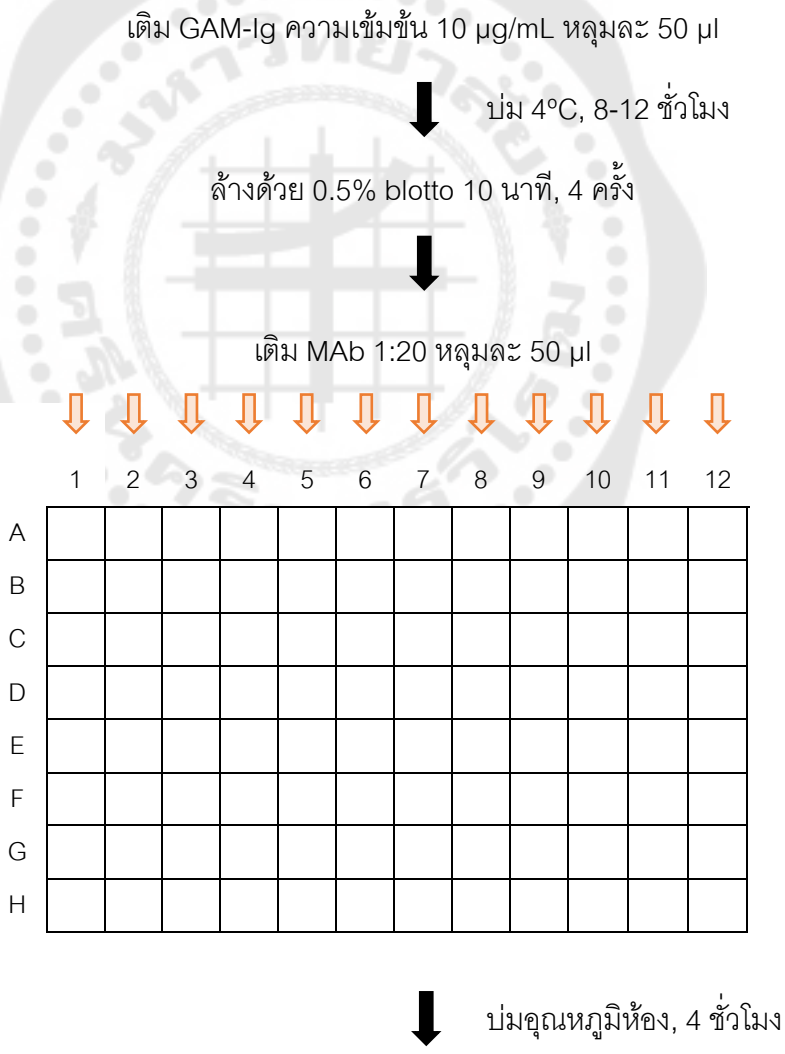
4.5.1 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting

นำแบคทีเรีย *F. columnare* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3 ในรูปแบบ heat killed ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL หยดลงบน nitrocellulose membrane ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มด้วย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แล้วบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ต้องการทดสอบ จากนั้นผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

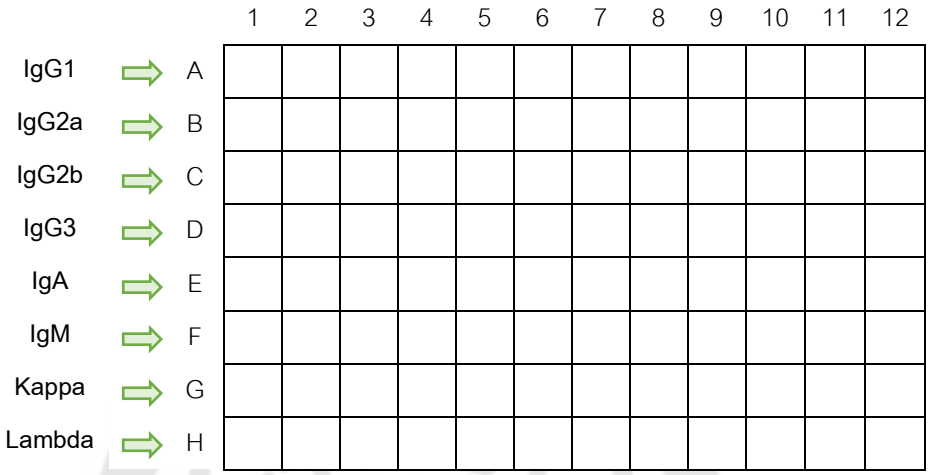
4.5.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA

การจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ทำการจำแนกด้วยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP) ทำการเคลือบ ELISA microtiter plate ด้วย goat anti-Mouse Ig heavy and light chain specific antibody (GAM-Ig) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม (ภาพประกอบ 6) บ่มที่อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที เติม 5% blotto และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:20 ใน 5%blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นเติม rabbit anti-isotype antibodies (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, Kappa และ Lambda) เจือจาง 1:50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถว แถวละ 1 ชนิด (A-H) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้าง

ด้วย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วเติม goat anti-rabbit IgG heavy chain and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP) เจือจาง 1:1,500 ใน 1% blotto ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที และล้างด้วย PBS ในครั้งสุดท้าย จากนั้นเติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย OPD 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ใน 0.1M citrate buffer pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader



เติม rabbit anti-isotype antibodies 1:50 หลุมละ 50 µl



บ่มอุณหภูมิห้อง, 4 ชั่วโมง

ล้างด้วย 0.5% blotto 10 นาที, 4 ครั้ง

เติม GAR-HRP 1:1,500 หลุมละ 50 µl

บ่มอุณหภูมิห้อง, 4 ชั่วโมง

ล้างด้วย 0.5% blotto 10 นาที, 4 ครั้ง

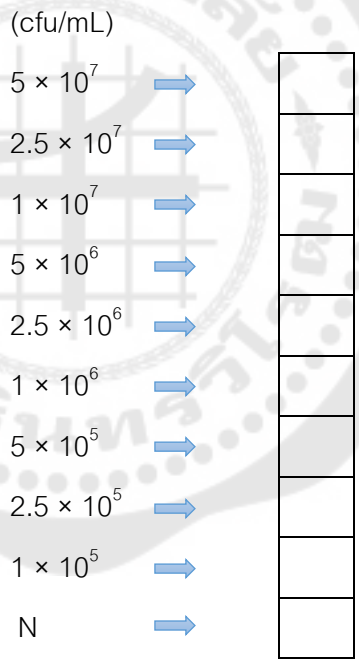
ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย OPD 1mg/mL, 0.006% H_2O_2 ใน 0.1M citrate buffer หลุมละ 100 µl, เป็นเวลา 5 นาที, หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4 หลุมละ 100 µl

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Thermo iEMS microplate reader

ภาพประกอบ 6 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

นำแบคทีเรีย *F. columnare* ในรูปแบบ heat killed ความเข้มข้น 5×10^7 ถึง 1×10^5 cfu/mL โดยทำการเจือจางแบบ serial dilution หยดลงบน nitrocellulose membrane (ภาพประกอบ 7) ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:20 ใน 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำมาบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:2,500 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำไปผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาจากนั้นตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุดสีดำสุดท้ายที่สังเกตได้ชัดเจน



ภาพประกอบ 7 รูปแบบการหยดแอนติเจนเพื่อทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

5. การทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* จากปลาหางนกยูงที่ชักนำให้มีการติดเชื้อด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีเทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

5.1 การเตรียมตัวอย่างปลาหางนกยูงโดยการชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย

นำปลาหางนกยูง (*P. reticulate*) จำนวน 35 ตัว ที่ซื้อจากตลาดปลาสวยงามจตุจักร กรุงเทพฯ มาเลี้ยงด้วยน้ำจืดที่อุณหภูมิห้องในตู้กระจกแล้วทำการสุ่มปลาจำนวน 5 ตัวมาตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นทำการแยกปลาเลี้ยงในตู้เลี้ยงปลาจำนวน 2 ตู้ โดยตู้แรกเลี้ยงจำนวน 15 ตัวสำหรับใช้เป็นชุดควบคุมโดยไม่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียและตู้ที่ 2 เลี้ยงปลาหางนกยูงเป็นจำนวน 15 ตัว เพื่อใช้เป็นชุดทดลองในการชักนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ด้วยวิธีการแช่ปลาในน้ำที่มีแบคทีเรียความเข้มข้น 10^7 cfu/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Dong, Senapin, LaFrentz, & Rodkhum, 2016) โดยทำการเตรียมแบคทีเรียตามขั้นตอนในข้อ 4.2.1 และปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้อยู่ในช่วง 10^9 cfu/mL ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 525nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 1.0 จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียในน้ำปริมาตร 2 ลิตรให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการสำหรับทำการแช่ปลา นำปลาที่ผ่านการแช่ไปเลี้ยงต่อในสภาพแวดล้อมปกติทำการเก็บตัวอย่างปลาที่ตายทุกวันและนำมาทำการตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. colunare* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตามหัวข้อ 4.1.2

5.2 การทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare* ในปลาหางนกยูงด้วยวิธี dot blotting เทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

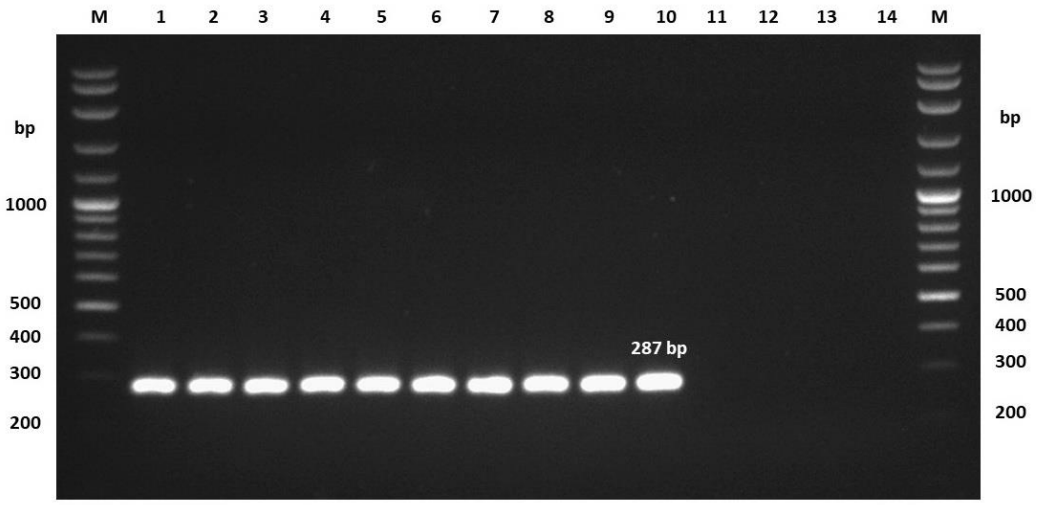
นำเหงือกปลาที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อจากข้อ 5.1 แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาทดสอบด้วยวิธี dot blotting โดยทำการบดเหงือกให้ละเอียดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (lysis buffer: 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบน nitrocellulose membrane ที่ขีดเป็นตารางขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตรช่องละ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน 5% blotto เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ เจือจาง 1:20 ใน 1% blotto บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำมาบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:2,500 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วนำไปผ่านกระบวนการ indirect immuno-peroxidase เช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 4.5.1 สำหรับเหงือกปลาที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้ออีกส่วนนำไปทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยทำการสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยชุดสกัดกรดนิวคลีอิก G-spin™ Total DNA extraction Kit ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 4.1.1 จากนั้นทำ

การทดสอบโดยใช้ชุด PCRBIO HS Taq DNA Polymerase ในการทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ และวิธีการเช่นเดียวกันกับการทดสอบก่อนหน้า

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

1. การตรวจสอบแบคทีเรีย *Flavobacterium columnare*

จากการตรวจสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพบว่าให้ผลผลิตของปฏิกิริยาขนาด 287 bp (ภาพประกอบ 8) กับตัวอย่างกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *F. columnare* ทุกไอโซเลตในขณะที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้ผลเป็นลบกับกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากแบคทีเรียอื่น ๆ ในตาราง 3



ภาพประกอบ 8 การตรวจสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตต่าง ๆด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการใช้ไพรเมอร์ Forward primer: FcoI_F 5'-AAT GAC TTC AAC TAG AAC AGT AGG TGC TGA-3' และReverse primer: FcoI_R 5'-CTT GTT TAT CAT AGA TCA TAG CTG ATG CTC C-3' ซึ่งจำเพาะต่อยีน *cslA* ของแบคทีเรีย *F. columnare* โดย *F. columnare* ไอโซเลตต่าง ๆที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ 1301 (1), AT (2), AT1703 (3), CC1802 (4), CC1805 (5), CN1808 (6), CUVET1213 (7), CUVET1346 (8), CUVET 1350(9) และ VN (10) ส่วนแบคทีเรียอื่น ๆได้แก่ *F. indicum* (11), *C. massiliae* (12), *V. vulnificus* (13), *A. hydrophila* (14) และ DNA molecular weight markers (M)

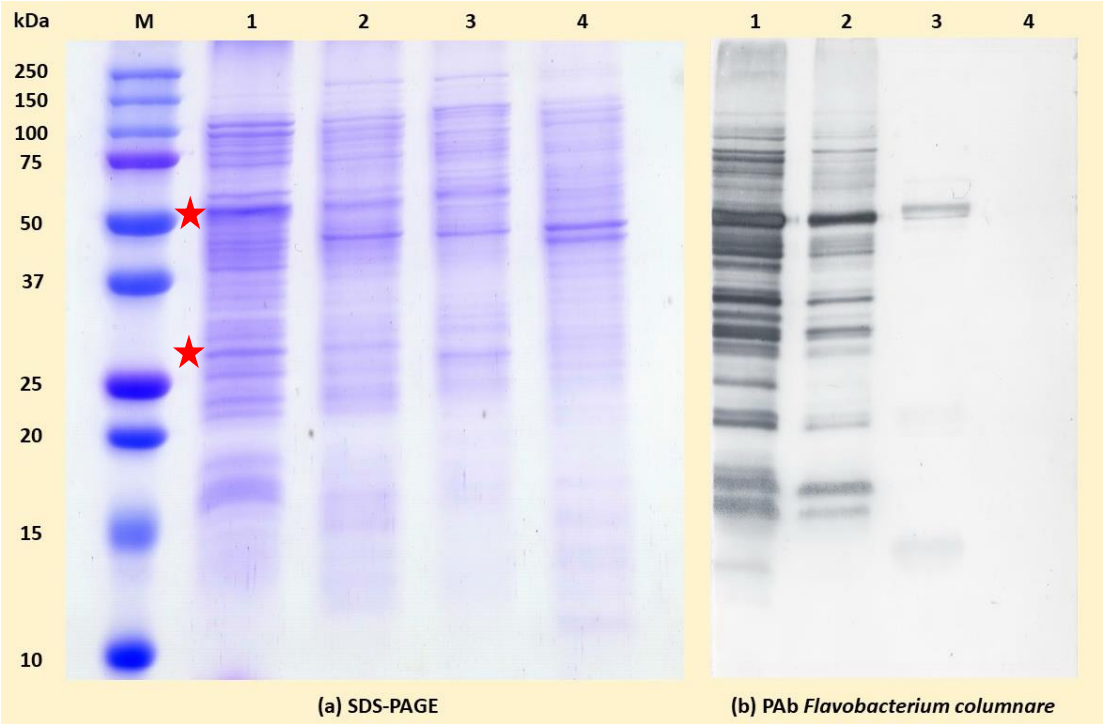
2. การเตรียมแอนติเจนและการปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว

2.1 การสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

ในการสกัดโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301เมื่อตรวจสอบรูปแบบโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301เปรียบเทียบกับรูปแบบโปรตีนของแบคทีเรียที่ได้จากการฆ่าแบคทีเรียด้วยความร้อนได้แก่ *F. columnare* ไอโซเลต 1301, *F. indicum* และ *A. hydrophila* ด้วย SDS-PAGE (ภาพประกอบ 9a) พบว่าโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 มีความแตกต่างกันเล็กน้อยกับรูปแบบโปรตีนที่ได้จากการฆ่าแบคทีเรียด้วยความร้อนจาก *F. indicum* (lane 3) แต่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนกับรูปแบบโปรตีนของแบคทีเรีย *A. hydrophila* (lane 4) อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ไม่มีความแตกต่างกันกับรูปแบบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน (lane 2) นอกจากนี้พบว่าโปรตีนจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 นั้นมีแถบโปรตีนขนาด 50 และ 30 กิโลดอลตันที่มีความเข้มข้นมากกว่าแถบโปรตีนอื่นอย่างชัดเจน

2.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting

หลังจากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวด้วยแอนติเจนในรูปแบบ OMP ที่ได้จากการสกัดเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 เมื่อทำการเก็บเลือดเพื่อแยกแอนติซีรัมสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบด้วยวิธี Western blotting พบว่าแอนติซีรัมจากหนูขาวที่มีการตอบสนองดีที่สุดสามารถจับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ในรูปแบบโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (ภาพประกอบ 9b lane 1) และโปรตีนที่ได้จากแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน (ภาพประกอบ 9b lane 2) นอกจากนี้พบว่า แอนติซีรัมของหนูขาวจับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. indicum* ได้เล็กน้อย (ภาพประกอบ 9b lane 3) อย่างไรก็ตามแอนติซีรัมของหนูขาวไม่จับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *A. hydrophila* (ภาพประกอบ 9b lane 4)



ภาพประกอบ 9 การตรวจสอบโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี SDS-PAGE และการทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมจากหนูขาวด้วยวิธี Western blotting โดย

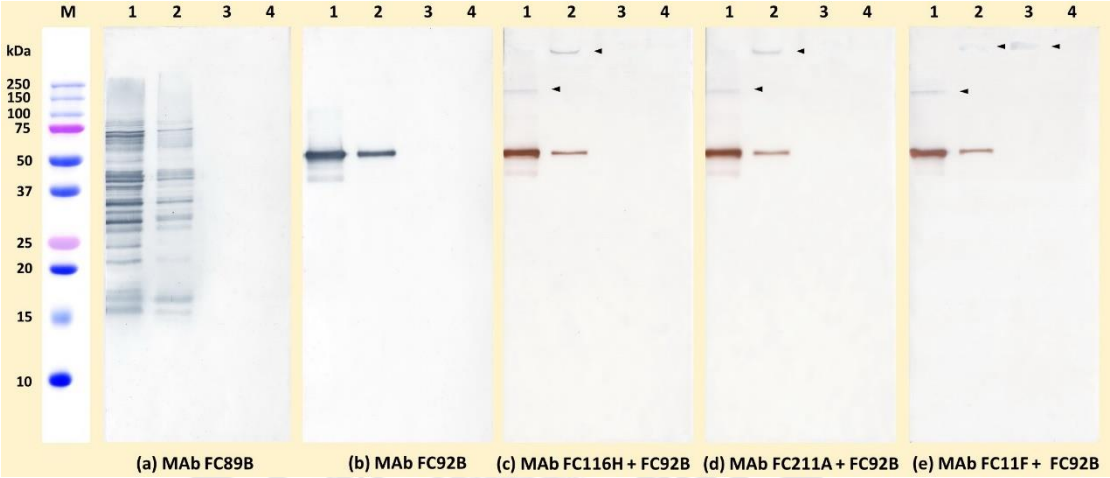
Lane 1 คือโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 และโปรตีนจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆที่ทำให้ตายด้วยความร้อน Lane 2 คือแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301, Lane 3 คือแบคทีเรีย *F. indicum* และ Lane 4 คือแบคทีเรีย *A. hydrophila* นำมาแยกขนาดโปรตีน โดยใช้ SDS-PAGE (a) เจลส่วนหนึ่งนำไปย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue อีกส่วนนำไปถ่ายลง nitrocellulose membrane (b) และนำไปทดสอบความจำเพาะต่อแอนติซีรัมของหนูขาว M คือโปรตีนมาตรฐาน ★: แถบโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare*

3. การผลิตและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

สามารถผลิตไฮบริโดมามาได้ทั้งหมด 7 โคลน (ตาราง 8) โดยแบ่งตามความจำเพาะได้ 6 กลุ่มคือ 1) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B สามารถจับกับโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนที่มีขนาดประมาณ 15-100 กิโลดอลตันเท่านั้น โดยไม่จับกับโปรตีนของแบคทีเรีย *F. indicum* และ *A. hydrophilla* (ภาพประกอบ 10a) และสามารถจับกับแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทุกไอโซเลตโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (ภาพประกอบ 11a) 2) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-92B จับกับโปรตีนจากแบคทีเรีย *F. columnare* เช่นเดียวกับกลุ่ม 1 แต่จับกับแถบโปรตีนที่มีขนาด 50 กิโลดอลตันเท่านั้น (ภาพประกอบ 10b) และจับแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทุกไอโซเลต (ภาพประกอบ 11b) 3) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-116H และ FC-211A จับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ขนาดโมเลกุลค่อนข้างสูงประมาณ 150 และ 250 กิโลดอลตัน (ภาพประกอบ 10c และ 10d lane 1 และ 2) โดยจับจำเพาะกับแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทุกไอโซเลตเท่านั้น (ภาพประกอบ 11c และ 11d) 4) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-41A สามารถจับจำเพาะกับแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทุกไอโซเลตโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (ภาพประกอบ 11e) แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้ไม่สามารถจับกับโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ได้เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ไม่ได้แสดงภาพประกอบ) 5) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-11F สามารถจับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ที่มีขนาดโมเลกุลค่อนข้างสูงเช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในกลุ่ม 3 (ภาพประกอบ 10e lane 1 และ 2) และยังสามารถจับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. indicum* ได้ที่ขนาดโปรตีนขนาด 250 กิโลดอนตัน (ภาพประกอบ 10e lane 3) และสามารถจับกับแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทุกไอโซเลต นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆได้อีกเช่น *C. massiliae* และ *E. tardar* (ภาพประกอบ 11f) และ 6) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-39B สามารถจับกับแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ทุกไอโซเลตและเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรีย *F. indicum*, *C. massiliae* และ *E. tardar* ได้เช่นเดียวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 5 (ภาพประกอบ 11g) แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มนี้ไม่สามารถจับกับแถบโปรตีนของแบคทีเรีย *F. columnare* ได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting (ไม่ได้แสดงภาพประกอบ)

สำหรับการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 ชนิดคือ FC-89B, FC-116H และ FC-211A เท่านั้นที่ให้ผลบวก พบว่าสามารถจับกับแบคทีเรีย *F. columnare* ในปลาหางนกยูงที่มีการ

ติดเชื้อนี้ได้ โดยพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆของปลาได้แก่ บริเวณเหงือก (ภาพประกอบ 12) บริเวณลำไส้ (ภาพประกอบ 13) และบริเวณกล้ามเนื้อ (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 10 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆที่ผลิตได้ด้วยวิธี Western blotting

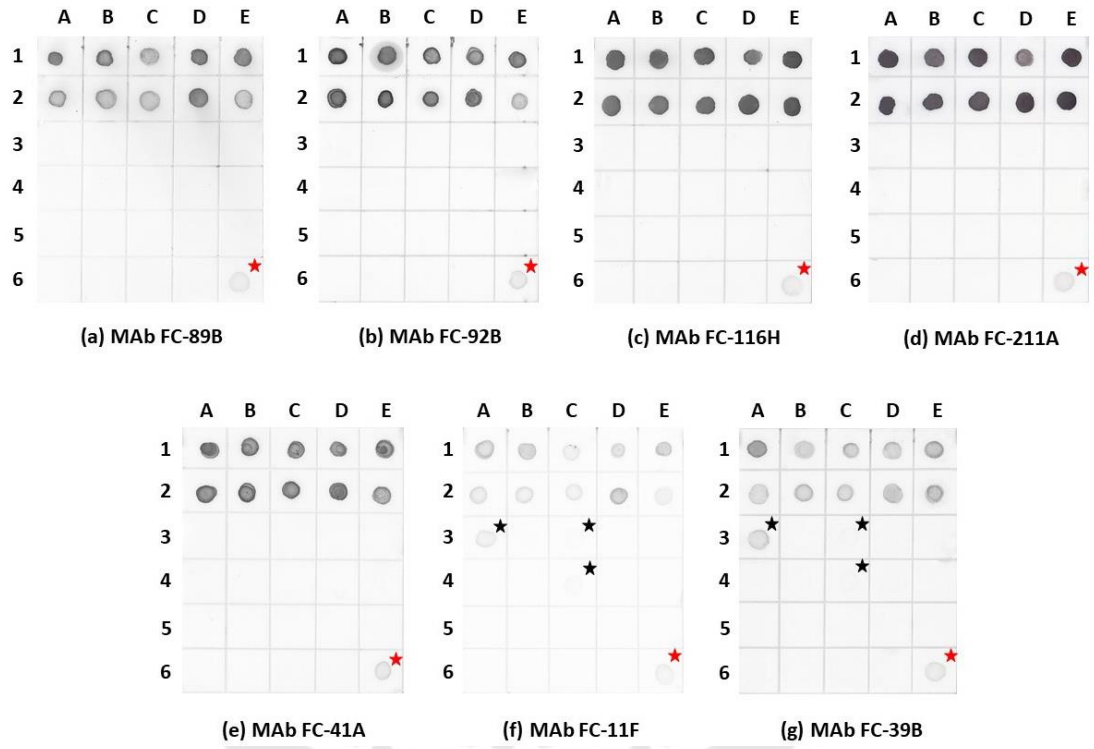
ทำโดยนำโปรตีนชนิดต่าง ๆได้แก่ Lane 1 โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301และโปรตีนของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆที่ทำให้ตายด้วยความร้อนได้แก่ Lane 2 แบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301, Lane 3 แบคทีเรีย *F. indicum* และ Lane 4 แบคทีเรีย *A. hydrophila* มาแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE แล้วนำไปถ่ายลง nitrocellulose membrane และนำไปทดสอบความจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆคือ FC-89B (a), FC-92B (b), FC-116H ผสมกับ FC-92B (c), FC-211A ผสมกับ FC-92B (d) และ FC-11F ผสมกับ FC-92B (e) ตามลำดับ M คือโปรตีนมาตรฐาน ◀: แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

4. การศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.1 ผลของการทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตต่าง ๆ และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 3 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B, FC-92B, FC-116H, FC-211A และ FC-41A ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ทุกไอโซเลต

โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่น ๆ สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-11F และ FC-39B พบว่ามีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* ทุกไอโซเลต เช่นกัน แต่เกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับแบคทีเรียอื่น ๆ ได้แก่ *F. indicum*, *C. massiliae* และ *E. tarda* อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทุกตัวเกิดการจับอย่างไม่จำเพาะกับแบคทีเรีย *S. aureus* (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 การทดสอบปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ด้วยวิธี dot blotting

โดยการใช้โปรตีนของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆที่ทำให้ตายด้วยความร้อนตามตาราง 3 ความเข้มข้น 10^8 cfu/mL หยดลงบน nitrocellulose membrane (1µl/หยด) แล้วนำมาทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B (a), FC-92B (b), FC-116H (c), FC-211A (d), FC-41A (e), FC-11F (f) และ FC-39B (g) ตามลำดับโดยแบคทีเรียที่ใช้ประกอบด้วย

แถวที่ 1: *F. columnare* ไอโซเลต ต่าง ๆ ได้แก่ 1301 (A), AT (B), AT1703 (C), CC1802 (D) และ CC1805 (E)

แถวที่ 2: *F. columnare* ไอโซเลต ต่าง ๆ ได้แก่ CN1808 (A), CUVET1213 (B), CUVET1346 (C), CUVET1350 (D) และ VN (E)

แถวที่ 3: *F. indicum* (A), *C. massiliae* (B), *C. taichungense* (C), *C. indologenes* ไอโซเลต 1252 (D) และ *C. indologenes* ไอโซเลต 25-2 (E)

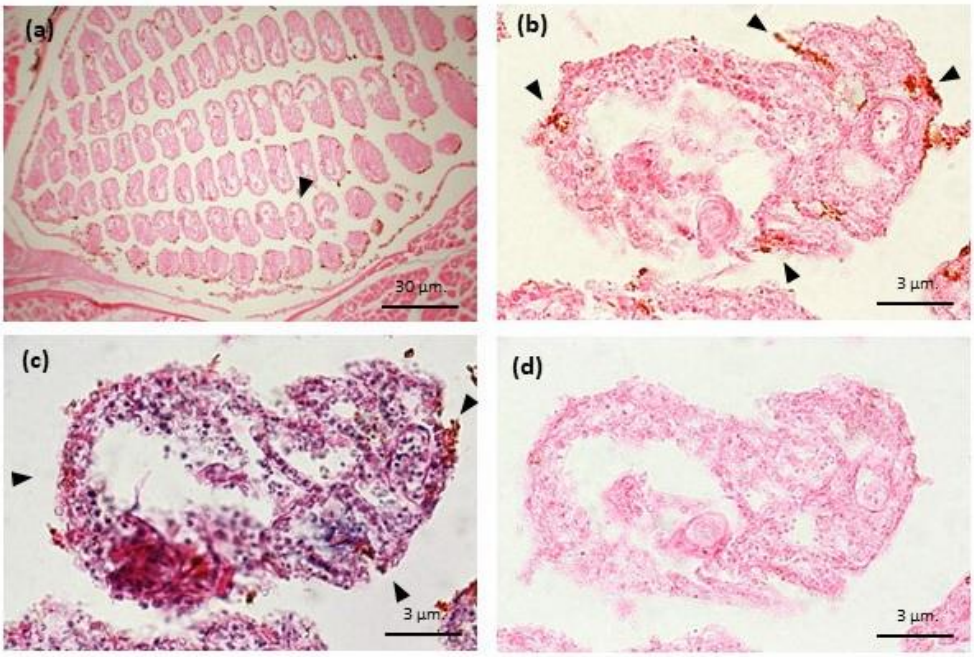
แถวที่ 4: *F. roseus* (A), *A. hydrophila* (B), *E. tarda* (C), *V. parahaemolyticus* (D) และ *V. harveyi* (E)

แถวที่ 5: *V. campbellii* (A), *V. vulnificus* (B), *V. alginolyticus* (C), *P. damska* (D) และ *P. aeruginosa* (E)

แถวที่ 6: *S. Hadar* (A), *S. flexneri* (B), *E. coli* (C), *S. agalactiae* (D) และ *S. aureus* (E)

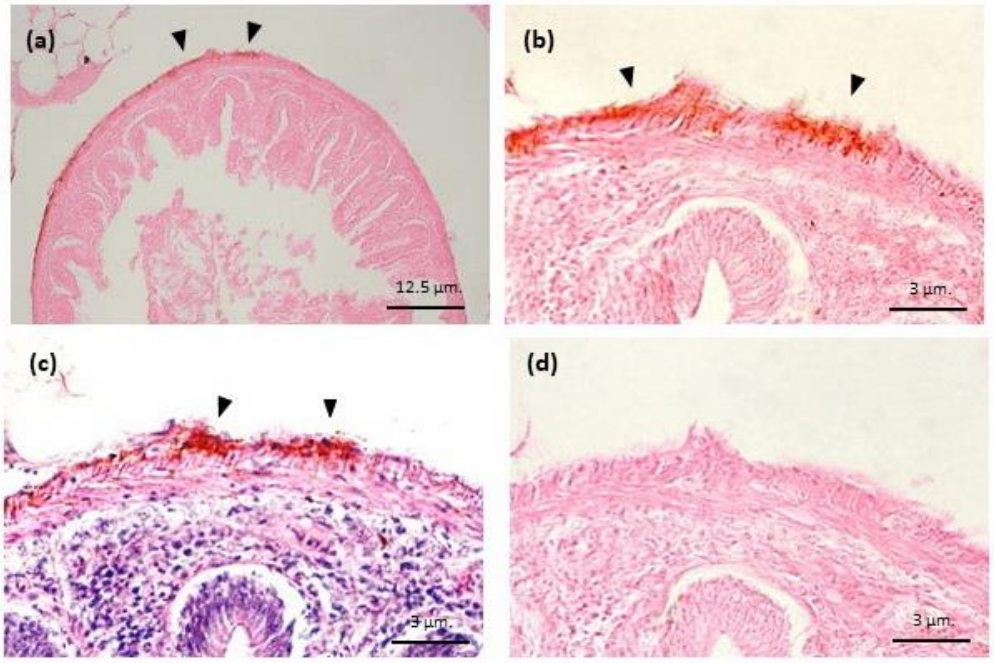
★ : เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่น

★ : เกิดการจับแบบไม่จำเพาะกับแบคทีเรียอื่น



ภาพประกอบ 12 เนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare*

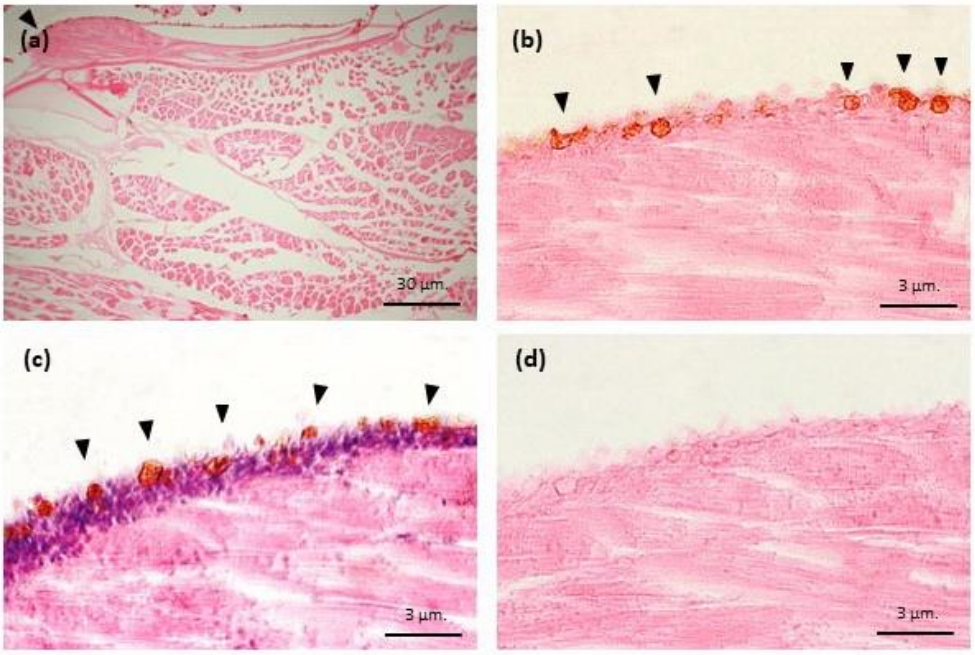
การทดสอบการติดเชื้อจากเนื้อเยื่อเหงือกของปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (a-c) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อเหงือกของปลาติดเชื้อที่ไม่ได้ทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (d) ด้วยวิธี immunohistochemistry เนื้อเยื่อเหงือกของปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แสดงให้เห็นบริเวณที่มีการติดเชื้อเป็นสีน้ำตาล โดยเนื้อเยื่อถูกย้อมด้วยสีอีโอซิน (a, b และ d) และย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (c), ▲: บริเวณที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย โดย (a) คือภาพที่มีกำลังขยายต่ำ (b, c และ d) คือภาพที่มีกำลังขยายสูง จากภาพเป็นการทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B



ภาพประกอบ 13 เนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้ของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare*

การทดสอบการติดเชื้อจากเนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้ของปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (a-c) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้ของปลาติดเชื้อที่ไม่ได้ทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (d) ด้วยวิธี immunohistochemistry เนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้ของปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แสดงให้เห็นบริเวณที่มีการติดเชื้อเป็นสีน้ำตาล โดยเนื้อเยื่อถูกย้อมด้วยสีอีโอซิน (a, b และ d) และย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน

(c), ▲: บริเวณที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย โดย (a) คือภาพที่มีกำลังขยายต่ำ (b, c และ d) คือภาพที่มีกำลังขยายสูง จากภาพเป็นการทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B



ภาพประกอบ 14 เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare*

การทดสอบการติดเชื้อจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (a-c) เปรียบเทียบกับกล้ามเนื้อของปลาติดเชื้อที่ไม่ได้ทดสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี (d) ด้วยวิธี immunohistochemistry กล้ามเนื้อของปลาที่ถูกชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* แสดงให้เห็นบริเวณที่มีการติดเชื้อเป็นสีน้ำตาล โดยเนื้อเยื่อถูกย้อมด้วยสีอีโอซิน (a, b และ d) และย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (c), ▲: บริเวณที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย โดย (a) คือภาพที่มีกำลังขยายต่ำ (b, c และ d) คือภาพที่มีกำลังขยายสูง จากภาพเป็นการทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B

4.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี sandwich ELISA

โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 7 ตัวที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มี class และ subclass เป็น IgG2a, IgG2b และ IgM (ตาราง 8) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B และ FC-92B มี class และ subclass เป็น IgG2b โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-116H และ FC-211A มี class เป็น IgM และโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-41A, FC11F และ FC39B มี class และ subclass เป็น IgG2a

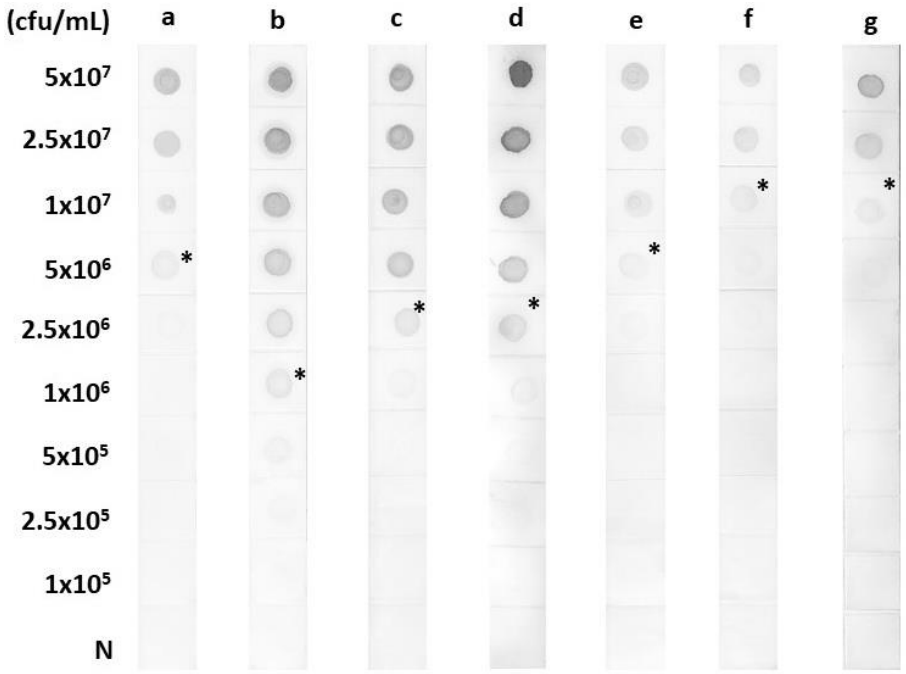
ตาราง **8** คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

กลุ่ม.	MAbs	Class/ subclass	Sensitivity; dot blotting (cfu/mL)	IHC	Western blotting (kDa)	การทดสอบปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกับกับแบคทีเรีย; dot blotting
1	FC-89B	IgG2b	5×10^6	+	~ 15-100	จำเพาะกับ *F. columnare*
2	FC-92B	IgG2b	1×10^6	-	~ 50	จำเพาะกับ *F. columnare*
3	FC-116H FC-211A	IgM	2.5×10^6	+	high MW	จำเพาะกับ *F. columnare*
4	FC-41A	IgG2a	5×10^6	-	-	จำเพาะกับ *F. columnare*
5	FC-11F	IgG2a	1×10^7	-	high MW	จำเพาะกับ *F. columnare* และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *F. indicum*, *C. massiliae* and *E. tarda*
6	FC-39B	IgG2a	1×10^7	-	-	จำเพาะกับ *F. columnare* และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ *F. indicum*, *C. massiliae* and *E. tarda*

หมายเหตุ: (+) = ปฏิกิริยาเชิงบวก, (-) = ปฏิกิริยาเชิงลบ; IHC = Immunohistochemistry; high MW = high molecular weight

4.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* โดยวิธี dot blotting ซึ่งมีความไวในการตรวจหาในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 × 10^7 ถึง 1 × 10^6 cfu/mL (ตาราง 8 และภาพประกอบ 15)



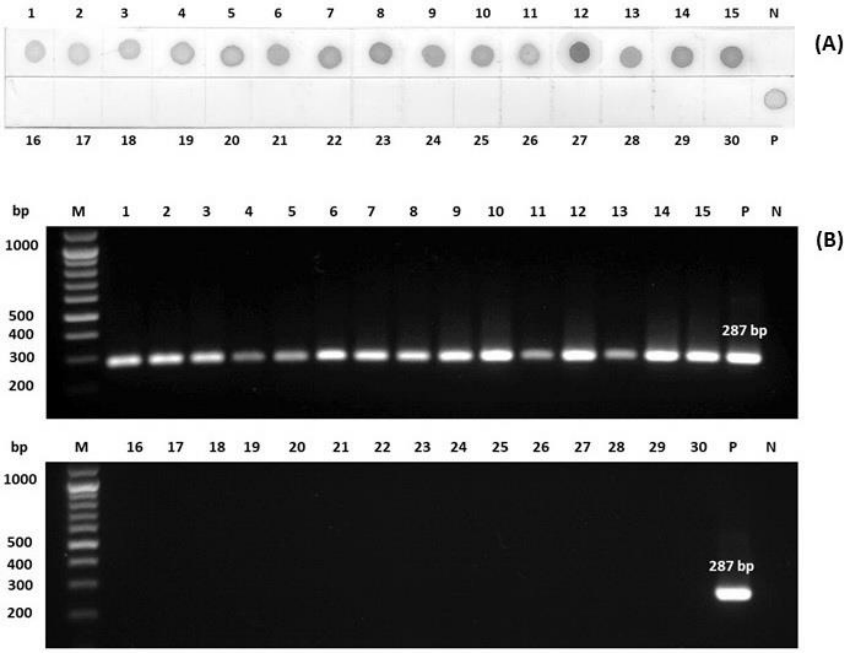
ภาพประกอบ 15 การทดสอบความไวในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการใช้แบคทีเรีย *F. columnare* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนความเข้มข้นตั้งแต่ 5 × 10^7 - 1 × 10^5 cfu/mL หยดลงบน nitrocellulose membrane (1µl/หยด) แล้วนำมาทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B (a) มีความไว 5 × 10^6 cfu/mL โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-92B (b) มีความไว 1 × 10^6 cfu/mL โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-116H (c) และ FC-211A (d) มีความไว 2.5 × 10^6 cfu/mL โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-41A (e) มีความไว 5 × 10^6 cfu/mL และโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-11F (f) และ FC-39B (g) มีความไว 1 × 10^7 cfu/mL (*) คือความเข้มข้น

ต่ำสุดของแบคทีเรียที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ (N) คือ แบคทีเรีย *F. indicum* ที่ทำให้ตายด้วยความร้อนความเข้มข้น 5×10^7 cfu/mL

4.4 การเปรียบเทียบการตรวจสอบการติดเชื้อ *Flavobacterium columnare* ในปลาหางนกยูงที่ชักนำให้ติดเชื้อ ด้วยวิธี dot blotting และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการตรวจปลาที่ถูกชักนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* พบว่าปลามีการตายอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องโดยมีอัตราการตายสะสม 80% และ 100% ใน 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ภายหลังจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพภายนอกของปลาที่ตายจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรีย *F. columnar* ไอโซเลตนี้ก่อโรครุนแรง แต่สามารถพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆภายในของปลาเช่นในส่วนของเหงือก (ภาพประกอบ 12) ลำไส้ (ภาพประกอบ 13) และกล้ามเนื้อ (ภาพประกอบ 14) เมื่อทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry สำหรับการตรวจสอบตัวอย่างปลาที่ชักนำให้ติดเชื้อ (No. 1 - 15) พบว่าตัวอย่างปลาทั้งหมดให้ผลบวก (15/15) เมื่อทดสอบด้วยวิธี dot blotting (ภาพประกอบ 16A) เปรียบเทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (ภาพประกอบ 16B) ส่วนตัวอย่างปลาที่ไม่ได้ชักนำให้ติดเชื้อซึ่งเป็นชุดควบคุม (No. 16 - 30) ให้ผลเป็นลบทั้งหมด โดยการทดสอบทั้ง 2 วิธี (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี dot blotting (A) เทียบกับผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (B)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจสอบปลาที่มีการชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (A) ทำการหยดสารสกัดจากเหงือกของตัวอย่างที่มีการติดเชื้อลำดับที่ 1 – 15 และตัวอย่างปลาที่ไม่มีการติดเชื้อลำดับ 16 – 30 บน nitrocellulose membrane และผ่านกระบวนการ dot blotting โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-92B เทียบกับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (B) โดยใช้ไพร์เมอร์ *cslA* – specific *F. columnare* ทดสอบกับตัวอย่างปลาเดียวกัน P = Positive control ใช้แบคทีเรีย *F. columnare*, N = Negative control ใช้แบคทีเรีย *F. indicum*, M = น้ำหนักโมเลกุลของ DNA มาตรฐาน (bp)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาขนาด 287 bp และให้ผลเป็นบวกกับแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลตอื่นที่นำมาทดสอบซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (Mabrok et al., 2020) ที่มีการใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *cslA* ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ที่ให้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาขนาด 287 bp เช่นกัน

การเตรียมแอนติเจนจากการสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย มีรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับการนำโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบหลายสายพันธุ์ เช่น *Aeromonas* spp. (Abdelhamed et al., 2017; Diao et al., 2020; He et al., 2020), *Vibrio* spp. (Guo et al., 2020; Tang et al., 2017) รวมไปถึง *Flavobacterium* spp. (Luo et al., 2016; Rahman et al., 2002) ไปพัฒนาเป็นวัคซีนเพื่อใช้สำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา เนื่องจากมีความเป็น immunogen สูงสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้เป็นอย่างดีเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนที่ได้จากการฆ่าแบคทีเรียด้วยความร้อน และวัคซีนที่ได้จากการทำ formalin-fixed (He et al., 2020; Luo et al., 2016; Xu et al., 2018) โดยการสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. columnare* ไอโซเลต 1301 เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับปลูกภูมิคุ้มกัน เมื่อทดสอบรูปแบบของโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่ามีการปรากฏของแถบโปรตีนหลายตำแหน่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman และคณะ ที่แสดงให้เห็นผลของการสกัดโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรีย *F. psychrophilum* (Rahman et al., 2002) โดยมีรูปแบบโปรตีนในลักษณะที่ใกล้เคียงกันกับงานวิจัยนี้ นอกจากนี้รายงานก่อนหน้าระบุว่าโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียประกอบด้วยหลายหน่วยย่อยของโปรตีน โดยหนึ่งในหน่วยย่อยของโปรตีนนั้นมีขนาดประมาณ 50 กิโลดอลตัน ซึ่งหน่วยย่อยของโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เป็นอย่างดี (He et al., 2020; Luo et al., 2016) แถบโปรตีนหลักที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้มีขนาดประมาณ 50 กิโลดอลตัน เช่นเดียวกันกับรายงานก่อนหน้า และเมื่อนำไปปลูกภูมิคุ้มกันในหนูขาว พบว่าหนูมีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่นำไปปลูกภูมิคุ้มกัน โดยมีการตอบสนองสูงกับโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 กิโลดอลตัน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวคือหนึ่งในหน่วยย่อยของโปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียตามที่มีรายงานมาก่อนหน้า

เมื่อนำหนูขาวที่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนดีที่สุดไปผลิตเซลล์ไฮบริโดมา สามารถผลิตเซลล์ไฮบริโดมาได้ทั้งสิ้น 7 โคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย *F. columnare* เท่านั้นหรือเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียอื่นเล็กน้อยคือโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B, FC-92B, FC-116H, FC-211A, FC-41A, FC-11F และ FC-39B โดยเมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blotting และวิธี dot blotting สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้เป็น 6 กลุ่ม โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B จับกับแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 15-100 กิโลดอลตัน โดยทั่วไปโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถจับกับแอนติเจนได้เพียงอิพิโทปเดียว จึงคาดว่าอิพิโทปดังกล่าวคือโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไกลโคซิเลต (glycosylated) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B จึงสามารถจับแถบโปรตีนดังกล่าวได้ (Olivares & Arias, 2011; Zhang, Arias, Shoemaker, & Klesius, 2006) โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-92B จับกับแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 50 กิโลดอลตัน ซึ่งคาดว่าจำเพาะต่อหนึ่งในหน่วยย่อยของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Luo et al., 2016) และสำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-116H, FC-211A และ FC-11F จับกับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ประมาณ 200 กิโลดอลตัล) ไม่สามารถแยกได้ด้วย SDS-PAGE เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวอยู่ระหว่างรอยต่อของ stacking gels และ separating gels คาดว่าโปรตีนดังกล่าวคือเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycans) ของผนังเซลล์ ซึ่งไม่สามารถละลายได้ด้วยสารละลาย SDS โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-41A และ FC-39B ไม่สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ *F. columnare* ด้วยวิธี Western blotting และเมื่อทดสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ซึ่งใช้เนื้อเยื่อของปลาหางนกยูง (*P. reticulate*) ที่ก่อนหน้าเคยมีรายงานการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ในปลาชนิดนี้ (Decostere et al., 1998) โดยทำการชักนำให้ติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* ตามวิธีการที่มีรายงาน (Dong et al., 2016) และนำมาทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่ามีโมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 ชนิดได้แก่ FC-89B, FC-116H และ FC-211A ที่สามารถใช้ในการระบุตำแหน่งของการติดเชื้อบนเนื้อเยื่อได้ ซึ่งจะเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาลักษณะของการเกิดโรคบนเนื้อเยื่อ และการศึกษาประสิทธิภาพของวัคซีนต่อไป โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ให้ผลเป็นบวกและตรวจพบการติดเชื้อ *F. columnare* ในหลายบริเวณของปลา ได้แก่ บริเวณเนื้อเยื่อเหงือก บริเวณผนังลำไส้ และบริเวณกล้ามเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับบริเวณที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *F. columnare* (Bernardet & Grimont, 1989; Hawke & Thune, 1992; Pate & Ordal, 1967)

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ (FC-89B, FC-92B, FC-116H, FC-211A และ FC-41A) จับจำเพาะกับแบคทีเรีย *F.* columnare ทุกไอโซเลตเท่านั้น มีเพียงโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-11F และ FC-39B สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับแบคทีเรีย *F. indicum*, *C. massiliae* และ *E. tarda* อย่างไรก็ตาม FC-39B ยังเกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* อีกด้วย ทั้งนี้การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดอาจเนื่องมาจากแบคทีเรีย *F. indicum* และ *C. massiliae* เป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *F. columnare* (Kim, Lim, Park, & Lee, 2005; Mabrok et al., 2020) ส่วนแบคทีเรีย *E. tarda* และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำซึ่งอาจมีโปรตีนบางส่วนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในสัตว์น้ำเหมือนกันกับแบคทีเรีย *F. columnare* อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกันระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 กับแบคทีเรีย *F. columnare* นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทุกตัวยังเกิดการจับแบบไม่จำเพาะกับแบคทีเรีย *S. aureus* เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตโปรตีนเอ (protein A) ที่สามารถจับกับ Fc region ของแอนติบอดีได้ (Christopoulos, 1996; Deisenhofer, 1981; Sasso, Silverman, & Mannik, 1991) การทดสอบ class/subclass และความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นพบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-89B และ FC-92B มี subclass เป็น IgG2b และมีความไวในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting ที่ 5×10^6 และ 1×10^6 cfu/mL ตามลำดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-116H และ FC-211A มี class เป็น IgM และมีความไวในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting ที่ 2.5×10^6 cfu/mL และโมโนโคลนอลแอนติบอดี FC-41A, FC-11F และ FC-39B มี subclass เป็น IgG2a และมีความไวในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ด้วยวิธี dot blotting ที่ 5×10^6 cfu/mL และ 1×10^7 cfu/mL ซึ่งมีความไวใกล้เคียงกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย โดยมีความไวในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ประมาณ 10^7-10^6 cfu/mL เช่นกัน (Jinapon et al., 2020) การเปรียบเทียบการตรวจสอบการติดเชื้อ *F. columnare* ในปลาหางนกยูงที่ชักนำให้ติดเชื้อ ด้วยวิธี dot blotting และปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถตรวจสอบกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ที่ความเข้มข้น 7 cfu/mL อย่างไรก็ตามหากทำการสกัดกรดนิวคลีอิกจากเนื้อเยื่อความไวในการทดสอบจะลดลงประมาณ 10 เท่า (Mabrok et al., 2020) ซึ่งจากการเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting สามารถใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ

ในปลาหางนกยูงได้อย่างมีประสิทธิภาพให้ผลการตรวจสอบที่ไม่แตกต่างจากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แม้ว่าวิธี dot blotting จะมีความไวน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แต่วิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อทำการสกัดกรดนิวคลีอิก และไม่จำเป็นต้องใช้สารละลายต่าง ๆสำหรับสกัดกรดนิวคลีอิก สามารถนำเอาเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบมา homogenate แล้วหยดลงบน nitrocellulose membrane ได้โดยตรง ซึ่งจะใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 6 ชั่วโมง สำหรับปัญหาที่เกิดขึ้นจากการนำเนื้อเยื่อที่มีเลือดปนมาใช้ทดสอบด้วยวิธี dot blotting นั้นสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้ 10 % hydrogen peroxide บ่มก่อนเป็นเวลา 45 นาที

ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* ในปลาติดเชื้อด้วยวิธี dot blotting ได้อย่างมีประสิทธิภาพนอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *F. columnare* ในเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆของปลาที่ติดเชื้อเพื่อใช้ยืนยันผลของการติดเชื้อได้ด้วยวิธี immunohistochemistry ดังนั้นการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย *F. columnare* นั้นจึงเป็นอีกหนึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ง่าย แม่นยำ รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และราคาถูก โดยไม่ต้องอาศัยการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ รวมทั้งการทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งสามารถช่วยในการป้องกันการเกิดและการระบาดของโรคคอลัมนาริสที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *F. columnare* ได้ต่อไป

บรรณานุกรม

Abdelhamed, H., Ibrahim, I., Baumgartner, W., Lawrence, M., & Karsi, A. (2017). Characterization of histopathological and ultrastructural changes in channel catfish experimentally infected with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Frontiers in microbiology,* 8, 1519.

Altinok, I., & Grizzle, J. (2001). Effects of low salinities on *Flavobacterium columnare* infection of euryhaline and freshwater stenohaline fish. *Journal of fish diseases,* 24(6), 361-367.

Anacker, R., & Ordal, E. (1959). Studies on the Myxobacterium chondrococcus columnaris: II. Bacteriocins. *Journal of bacteriology,* 78(1), 33.

Andrew, A. (2019). Fish Health News You Can Use. *Pacific Region Fish Health Program*.

Aranishi, F., Mano, N., Nakane, M., & Hirose, H. (1998). Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. *Fish Physiology and Biochemistry,* 19(3), 197-203.

Bader, J., Klesius, P., & Vinitnantharat, S. (1997). Comparison of whole-cell antigens of pressure-and formalin-killed Flexibacter columnaris from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *American journal of veterinary research,* 58(9), 985-988.

Bader, J., Shoemaker, C., & Klesius, P. (2005). Production, characterization and evaluation of virulence of an adhesion defective mutant of *Flavobacterium columnare* produced by β-lactam selection. *Letters in applied microbiology,* 40(2), 123-127.

Bandilla, M., Valtonen, E., Suomalainen, L., Aphalo, P., & Hakalahti, T. (2006). A link between ectoparasite infection and susceptibility to bacterial disease in rainbow trout. *International journal for parasitology,* 36(9), 987-991.

Bebak, J., Matthews, M., & Shoemaker, C. (2009). Survival of vaccinated, feed-trained largemouth bass fry (Micropterus salmoides floridanus) during natural exposure to *Flavobacterium columnare*. *Vaccine,* 27(32), 4297-4301.

Bernardet, J., & Bowman, J. (2006). The genus flavobacterium. *The Prokaryotes: Volume 7*: *Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*, 481-531.

Bernardet, J., & Grimont, P. (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 39(3), 346-354.

Bernardet, J., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., & Vandamme, P. (1996). Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus Flavobacterium, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov.(basonym, Cytophaga aquatilis Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 46(1), 128-148.

Boutin, B., Bernatchez, L., Audet, C., & Derome, N. (2012). Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. *Veterinary Microbiology,* 155(2-4), 355-361.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry,* 72(1-2), 248-254.

Bullock, G. (1986). Columnaris disease of fishes.

Cain, K., & LaFrentz, B. (2007). Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*. *Current protocols in microbiology,* 6(1), 13B. 11.11-13B. 11.12.

Camilli, A., & Bassler, B. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science,* 311(5764), 1113-1116.

Christopoulos, T. (1996). Chapter 10-Immunoassay Configurations. In: Immunoassay Academic Press.

Conrad, J., Holt, R., & Kreps, T. (1975). Ozone disinfection of flowing water. *The Progressive Fish-Culturist,* 37(3), 134-136.

Cunningham, F., Jack, S., Hardin, D., & Wills, R. (2012). Pond-Level risk factors associated

with columnaris disease on Mississippi commercial catfish farms. *Journal of Aquatic Animal Health,* 24(3), 178-184.

Dalsgaard, I. (1993). Virulence mechanisms in Cytophaga psychrophila and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases,* 3, 127-144.

Darwish, A., Ismaiel, A., Newton, J., & Tang, J. (2004). Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. *Molecular and cellular probes,* 18(6), 421-427.

Darwish, A., Mitchell, A., & Straus, D. (2009). Evaluation of potassium permanganate against an experimental subacute infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of fish diseases,* 32(2), 193-199.

Darwish, A., Mitchell, A., & Straus, D. (2012). Evaluation of a 4-h static copper sulphate treatment against experimental infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture Research,* 43(5), 688-695.

Davis, H. (1922). *A new bacterial disease of fresh-water fishes*: US Government Printing Office.

Declercq, A., Boyen, F., Van, W., Bossier, P., Karsi, A., Haesebrouck, F., & Decostere, A. (2013). Antimicrobial susceptibility pattern of *Flavobacterium columnare* isolates collected worldwide from 17 fish species. *Journal of fish diseases,* 36(1), 45-55.

Declercq, A., Haesebrouck, F., Van, W., Bossier, P., & Decostere, A. (2013). Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary research,* 44(1), 27.

Decostere, A. (2002). *Flavobacterium columnare* infections in fish: the agent and its adhesion to the gill tissue. *Verhandelingen-Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België,* 64(6), 421-430.

Decostere, A., & Haesebrouck, F. (1999). Outbreak of columnaris disease in tronical aquarium fish. In: British Medical Journal Publishing Group.

Decostere, A., Haesebrouck, F., & Devriese, A. (1998). Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. *Veterinary Microbiology,* 62(1), 35-45.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Turnbull, J., & Charlier, G. (1999). Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. *Journal of fish diseases,* 22(1), 1-11.

Decostere, A., Haesebrouck, F., Van Driessche, E., Charlier, G., & Ducatelle, R. (1999). Characterization of the adhesion of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) to gill tissue. *Journal of fish diseases,* 22(6), 465-474.

Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9-and 2.8-. ANG. resolution. *Biochemistry,* 20(9), 2361-2370.

Diao, J., Li, L., Fan, Y., Wang, S., Gai, C., Wang, Y., . . . Ye, H. (2020). Recombinant outer membrane protein C of Aeromonas salmonicida subsp. masoucida, a potential vaccine candidate for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Microbial pathogenesis*, 104211.

Dong, H., Senapin, S., LaFrentz, B., & Rodkhum, C. (2016). Virulence assay of rhizoid and non‐rhizoid morphotypes of Flavobacterium columnare in red tilapia, Oreochromis sp., fry. *Journal of fish diseases,* 39(6), 649-655.

Durborow, R., Thune, R., Hawke, J., & Camus, A. (1998). Columnaris disease: a bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare.* Southern Regional Aquaculture Center, Publication No. 479. Stoneville, Mississippi. *US Department of Agriculture: Stoneville, MS, USA*.

Ferguson, H. (2006). Systemic pathology of Fish. *A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts.*

Figueiredo, H., Klesius, P., Arias, C., Evans, J., Shoemaker, C., Pereira Jr, D., & Peixoto, M. (2005). Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of fish diseases,* 28(4), 199-204.

Fijan, N. (1969). Antibiotic additives for the isolation of Chondrococcus columnaris from

fish. *Applied microbiology,* 17(2), 333.

Fujihara, M., & Nakatani, R. (1971). Antibody production and immune responses of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. *Journal of the Fisheries Board of Canada,* 28(9), 1253-1258.

Garcia, J., LaFrentz, B., Waldbieser, G., Wong, F., & Chang, S. (2018). Characterization of atypical *Flavobacterium columnare* and identification of a new genomovar. *J. Fish Dis*.

Gaunt, P., Gao, D., Sun, F., & Endris, R. (2010). Efficacy of florfenicol for control of mortality caused by *Flavobacterium columnare* infection in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health,* 22(2), 115-122.

Grabowski, L., LaPatra, S., & Cain, K. (2004). Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *Journal of fish diseases,* 27(10), 573-581.

Griffin, B. (1991). Characteristics of a chondroitin AC lyase produced by Cytophaga columnaris. *Transactions of the American Fisheries Society,* 120(3), 391-395.

Guo, S., He, L., Wu, L., Xiao, Y., Zhai, S., & Yan, Q. (2020). Immunization of a novel bivalent outer membrane protein simultaneously resisting Aeromonas hydrophila, Edwardsiella anguillarum and Vibrio vulnificus infection in European eels (Angullia angullia). *Fish & shellfish immunology,* 97, 46-57.

Hawke, J., & Thune, R. (1992). Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health,* 4(2), 109-113.

He, L., Wu, L., Tang, Y., Lin, P., Zhai, S., Xiao, Y., & Guo, S. (2020). Immunization of a novel outer membrane protein from Aeromonas hydrophila simultaneously resisting A. hydrophila and Edwardsiella anguillarum infection in European eels (Angullia angullia). *Fish & shellfish immunology,* 97, 300-312.

Holt, R. (1987). Cytophaga psychrophila, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish.

Hunter, S., Bibb, W., Shih, N., Kaufmann, A., Mitchell, J., & McKinney, R. (1986). Enzyme-

linked immunosorbent assay with major outer membrane proteins of Brucella melitensis to measure immune response to Brucella species. *Journal of clinical microbiology,* 24(4), 566-572.

Huogeng, H., Chengzhu, W., & Changfu, C. (2010). Immune response of bluntnose black bream to outer membrane protein of three pathogenic bacteria. *Feed Industry*(12), 5.

Jinapon, C., Wangman, P., Pengsuk, C., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, P., & Longyant, S. (2020). Development of monoclonal antibodies for the rapid detection and identification of Salmonella enterica serovar Enteritidis in food sample using dot-blot assays. *Journal of Food Safety*, e12841.

Kim, K., Lim, M., Park, J., & Lee, S. (2005). Transfer of Chryseobacterium meningosepticum and Chryseobacterium miricola to Elizabethkingia gen. nov. as Elizabethkingia meningoseptica comb. nov. and Elizabethkingia miricola comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,* 55(3), 1287-1293.

Kitiyodom, S., Kaewmalun, S., Nittayasut, N., Suktham, K., Surassmo, S., Namdee, K., . . . Yata, T. (2019). The potential of mucoadhesive polymer in enhancing efficacy of direct immersion vaccination against *Flavobacterium columnare* infection in tilapia. *Fish & shellfish immunology,* 86, 635-640.

Klesius, P., Pridgeon, J., & Aksoy, M. (2010). Chemotactic factors of *Flavobacterium columnare* to skin mucus of healthy channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *FEMS Microbiology Letters,* 310(2), 145-151.

Klesius, P., Shoemaker, C., & Evans, J. (2008). *Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel catfish mucus. *FEMS Microbiology Letters,* 288(2), 216-220.

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature,* 256(5517), 495-497.

Koski, P., & Bernardet, J. (1993). *Flexibacter columnaris* infection in Artic char (*Salvelinus alpinus* (L.)) first isolation in Finland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*.

Kumar, G., Rathore, G., & El-Matbouli, M. (2014). Outer membrane protein assembly factor YaeT (omp85) and GroEL proteins of Edwardsiella tarda are immunogenic antigens for Labeo rohita (Hamilton). *J Fish Dis,* 37, 1055-1059.

Kunttu, H., Jokinen, E., Valtonen, E., & Sundber, L. (2011). Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. *Journal of Applied Microbiology,* 111(6), 1319-1326.

Kunttu, H., Sundberg, L., Pulkkinen, K., & Valtonen, E. (2012). Environment may be the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. *Environmental Microbiology Reports,* 4(4), 398-402.

Kunttu, H., Suomalainen , L., Jokinen, E., & Valtonen, E. (2009). *Flavobacterium columnare* colony types: connection to adhesion and virulence? *Microbial pathogenesis,* 46(1), 21-27.

Kunttu, H., Valtonen, E., Jokinen, E., & Suomalainen, L. (2009). Saprophytism of a fish pathogen as a transmission strategy. *Epidemics,* 1(2), 96-100.

Laanto, E., Sundberg, L., & Bamford, J. (2011). Phage specificity of the freshwater fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl. Environ. Microbiol.,* 77(21), 7868-7872.

LaFrentz, B., Garcia, J., Dong, H., Waldbieser, G., Rodkhum, C., Wong, F., & Chang, S. (2017). Optimized reverse primer for 16S-RFLP analysis and genomovar assignment of *Flavobacterium columnare*. *Journal of fish diseases,* 40(8), 1103-1108.

LaFrentz, B., Garcia, J., & Shelley, J. (2019). Multiplex PCR for genotyping *Flavobacterium columnare*. *Journal of fish diseases,* 42(11), 1531-1542.

LaFrentz, B., Garcia, J., Waldbieser, G., Evenhuis, J., Loch, T., Liles, P., . . . Chang, S. (2018). Identification of four distinct phylogenetic groups in *Flavobacterium columnare* with fish host associations. *Frontiers in microbiology,* 9, 452.

Lafrentz, B., Goodwin, J., & Shoemaker, C. (2012). Columnaris Disease. *Book Chapter*, 3.

LaFrentz, B., & Klesius, P. (2009). Development of a culture independent method to

characterize the chemotactic response of *Flavobacterium columnare* to fish mucus. *Journal of microbiological methods,* 77(1), 37-40.

LaFrentz, B., LaPatra, S., Shoemaker, C., & Klesius, P. (2012). Reproducible challenge model to investigate the virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms,* 101(2), 115-122.

LaFrentz, B., Waldbieser, G., Welch, T., & Shoemaker, C. (2014). Intragenomic heterogeneity in the 16 S r RNA genes of *Flavobacterium columnare* and standard protocol for genomovar assignment. *Journal of fish diseases,* 37(7), 657-669.

Loch, T., & Faisal, M. (2015). Emerging flavobacterial infections in fish: a review. *Journal of advanced research,* 6(3), 283-300.

Luo, Z., Fu, J., Li, N., Liu, Z., Qin, T., Zhang, X., & Nie, P. (2016). Immunogenic proteins and their vaccine development potential evaluation in outer membrane proteins (OMPs) of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture and Fisheries,* 1, 1-8.

Mabrok, M., Chokmangmeepisarn, P., LaFrentz, B., Kayansamruaj, P., Dong, H., & Rodkhum, C. (2020). Development of a species-specific polymerase chain reaction for highly sensitive detection of *Flavobacterium columnare* targeting chondroitin AC lyase gene. *Aquaculture*, 734597.

Merrifield, D., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S., Baker, R., Bogwald, J., . . . Ringo, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture,* 302(1-2), 1-18.

Moore, A., Eimers, M., & Cardella, M. (1990). Attempts to control *Flexibacter columnaris* epizootics in pond-reared channel catfish by vaccination. *Journal of Aquatic Animal Health,* 2(2), 109-111.

Morley, N., & Lewis, J. (2010). Consequences of an outbreak of columnaris disease *(Flavobacterium columnare*) to the helminth fauna of perch (*Perca fluviatilis*) in the Queen Mary reservoir, south-east England. *Journal of helminthology,* 84(2), 186-192.

Newton, J., Wood, T., & Hartley, M. (1997). Isolation and partial characterization of

extracellular proteases produced by isolates of *Flavobacterium columnare* derived from channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health,* 9(2), 75-85.

Olivares-Fuster, O., Bullard, S., McElwain, A., Llosa, M., & Arias, C. (2011). Adhesion dynamics of *Flavobacterium columnare* to channel catfish *Ictalurus punctatus* and zebrafish *Danio rerio* after immersion challenge. *Diseases of Aquatic Organisms,* 96(3), 221-227.

Olivares, O., & Arias, C. (2011). Development and characterization of rifampicin-resistant mutants from high virulent strains of *Flavobacterium columnare*. *Journal of fish diseases,* 34(5), 385-394.

Olivares, O., Baker, J., Terhune, J., Shoemaker, C., Klesius, P., & Arias, C. (2007). Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. *Systematic and Applied Microbiology,* 30(8), 624-633.

Ourth, D., & Bachinski, L. (1987). Bacterial sialic acid modulates activation of the alternative complement pathway of channel catfish (*Ictaluruspunctatus*). *Developmental & Comparative Immunology,* 11(3), 551-564.

Pacha, R., & Ordal, E. (1967). Histopathology of experimental columnaris disease in young salmon. *Journal of Comparative Pathology,* 77(4), 419-423.

Panangala, V., Shelby, R., Shoemaker, C., Klesius, P., Mitra, A., & Morrison, E. (2006). Immunofluorescent test for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. *Diseases of Aquatic Organisms,* 68(3), 197-207.

Panangala, V., Shoemaker, C., & Klesius, P. (2007). TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture Research,* 38(5), 508-517.

Pate, J., & Ordal, E. (1967). The fine structure of Chondrococcus columnaris: III. the surface layers of *Chondrococcus columnaris*. *The Journal of cell biology,* 35(1), 37-51.

Pongnumpai, J., & Chitmanat, C. (2017). Columnaris disease in fish. *Veterinary Integrative Sciences,* 15(2), 63-78.

Prasad, Y., Kumar, D., & Sharma, A. (2011). Lytic bacteriophages specific to

Flavobacterium columnare rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease. *Journal of environmental biology,* 32(2), 161-168.

Rahman, M., Kuroda, A., Dijkstra, J., Kiryu, I., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish & shellfish immunology,* 12(2), 169-179.

Rehulka, J., & Minarik, B. (2007). Blood parameters in brook trout Salvelinus fontinalis (Mitchill, 1815), affected by columnaris disease. *Aquaculture Research,* 38(11), 1182-1197.

Riley, T. (2000). *Treatment of Flavobacterium columnare and toxicity of chloramine-T in channel catfish, Ictalurus punctatus.* Auburn University,

Romero, M., Avendano-Herrera, R., Magarinos, B., Camara, M., & Otero, A. (2010). Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen Tenacibaculum maritimum, a member of the Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides (CFB) group. *FEMS Microbiology Letters,* 304(2), 131-139.

Rucker, R., Earp, B., & Ordal, E. (1954). Infectious diseases of Pacific salmon. *Transactions of the American Fisheries Society,* 83(1), 297-312.

Sarker, S., Abraham, T., Banerjee, S., Adikesavalu, H., & Patra, A. (2017). Characterization, virulence and pathology of *Flavobacterium* sp. KG3 associated with gill rot in carp, *Catla catla* (Ham.). *Aquaculture,* 468, 579-584.

Sasso, E., Silverman, G., & Mannik, M. (1991). Human IgA and IgG F (ab') 2 that bind to staphylococcal protein A belong to the VHIII subgroup. *The Journal of Immunology,* 147(6), 1877-1883.

Serrano, P. (2005). *Responsible use of antibiotics in aquaculture*: Food & Agriculture Org.

Shieh, H. (1980). Studies on the nutrition of a fish pathogen, *Flexibacter columnaris*. *Microbios Letters,* 13(51/52), 129-133.

Shoemaker, C., Klesius, P., Drennan, J., & Evans, J. (2011). Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish & shellfish immunology,* 30(1), 304-308.

Shoemaker, C., Klesius, P., & Evans, J. (2007). Immunization of eyed channel catfish,

Ictalurus punctatus, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. *Vaccine,* 25(6), 1126-1131.

Shoemaker, C., Shelby, R., & Klesius, P. (2003). Development of an indirect ELISA to detect humoral response to *Flavobacterium columnare* infection of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Applied Aquaculture,* 14(1-2), 43-52.

Soto, E., Mauel, M., Karsi, A., & Lawrence, M. (2008). Genetic and virulence characterization of *Flavobacterium columnare* from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Applied Microbiology,* 104(5), 1302-1310.

Speare, D., Markham, R., Despres, B., Whitman, K., & MacNair, N. (1995). Examination of gills from salmonids with bacterial gill disease using monoclonal antibody probes for *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 7(4), 500-505.

Staroscik, A., & Nelson, D. (2008). The influence of salmon surface mucus on the growth of *Flavobacterium columnare*. *Journal of fish diseases,* 31(1), 59-69.

Sun, F., Peatman, E., Li, C., Liu, S., Jiang, Y., Zhou, Z., & Liu, Z. (2012). Transcriptomic signatures of attachment, NF-**K**B suppression and IFN stimulation in the catfish gill following columnaris bacterial infection. *Developmental & Comparative Immunology,* 38(1), 169-180.

Suomalainen, L., Bandilla, M., & Valtonen, E. (2009). Immunostimulants in prevention of columnaris disease of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases,* 32(8), 723-726.

Suomalainen, L., Reunanen, H., Ijas, R., Valtonen, E., & Tiirola, M. (2006). Freezing induces biased results in the molecular detection of *Flavobacterium columnare*. *Appl. Environ. Microbiol.,* 72(2), 1702-1704.

Suomalainen, L., Tiirola, M., & Valtonen, E. (2005a). Effect of Pseudomonas sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. *Diseases of Aquatic Organisms,* 63(1), 61-68.

Suomalainen, L., Tiirola, M., & Valtonen, E. (2005b). Influence of rearing conditions on

Flavobacterium columnare infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases,* 28(5), 271-277.

Suomalainen, L., Tiirola, M., & Valtonen, E. (2005c). Treatment of columnaris disease of rainbow trout: low pH and salt as possible tools? *Diseases of Aquatic Organisms,* 65(2), 115-120.

Suzuki, M., Rappe, M., & Giovannoni, S. (1998). Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.,* 64(11), 4522-4529.

Tang, X., Wang, H., Liu, F., Sheng, X., Xing, J., & Zhan, W. (2017). Outer membrane protein A: An immunogenic protein induces highly protective efficacy against *Vibrio ichthyoenteri*. *Microbial pathogenesis,* 113, 152-159.

Thomas, S., & Goodwin, A. (2004). Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. *Journal of fish diseases,* 27(1), 23-28.

Tripathi, N., Latimer, K., Gregory, C., Ritchie, B., Wooley, R., & Walker, R. (2005). Development and evaluation of an experimental model of cutaneous columnaris disease in koi *Cyprinus carpio*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,* 17(1), 45-54.

Vale, A., Marques, F., & Silva, M. (2003). Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with Photobacterium damselae subsp. piscicida. *Fish & shellfish immunology,* 15(2), 129-144.

Wagner-Dobler, I., Thiel, V., Eberl, L., Allgaier, M., Bodor, A., Meyer, S., . . . Schulz, S. (2005). Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem,* 6(12), 2195-2206.

Wagner, B., Wise, D., Khoo, L., & Terhune, J. (2002). The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health,* 14(4),

263-272.

Wakabayashi, H. (1999). Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes. *Fish pathology,* 34(2), 65-71.

Welker, T., Shoemaker, C., Arias, C., & Klesius, P. (2005). Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Diseases of Aquatic Organisms,* 63(2-3), 129-138.

Xia, L., Wang, C., & Chen, C. (2007). Immune response of channal catfish to outer membrane protein of three pathogenic bacteria. *Journal huazhong agricultural university,* 26(3), 371.

Xu, G., Tang, X., Shang, X., Li, Y., Wang, J., & Yue, J. (2018). Identification of immunogenic outer membrane proteins and evaluation of their protective efficacy against *Stenotrophomonas maltophilia*. *BMC infectious diseases,* 18(1), 1-9.

Yeh, H., Shoemaker, C., & Klesius, P. (2006). Sensitive and rapid detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Applied Microbiology,* 100(5), 919-925.

Zhang, Y., Arias, C., Shoemaker, C., & Klesius, P. (2006). Comparison of lipopolysaccharide and protein profiles between Flavobacterium columnare strains from different genomovars. *Journal of fish diseases,* 29(11), 657-663.

Zhao, H., Li, C., Beck, B., Zhang, R., Thongda, W., Davis, D., & Peatman, E. (2015). Impact of feed additives on surface mucosal health and columnaris susceptibility in channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *Fish & shellfish immunology,* 46(2), 624-637.

ไพศาล, ส. (2005). วิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

ชนกันต์, จ. (2013). โรคปลานิล. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร, 11(1), 75-86.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Cytophaga ager

Tryptone	2.00 กรัม
Beef extract	0.50 กรัม
Yeast extract	0.50 กรัม
Sodium acetate	0.20 กรัม
agar	10.0 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.9 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Cytophag broth

Tryptone	2.00 กรัม
Beef extract	0.50 กรัม
Yeast extract	0.50 กรัม
Sodium acetate	0.20 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.9 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tryptic soy agar (TSA)

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	3.00 กรัม
Dextrose	2.50 กรัม
NaCl	5.00 กรัม
K_2HPO_4	2.50 กรัม
agar	15.0 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.3 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Tryptic soy broth (TSB)

Tryptone	17.0 กรัม
Soytone	3.00 กรัม
Dextrose	2.50 กรัม
NaCl	5.00 กรัม
K_2HPO_4	2.50 กรัม
agar	15.0 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล. pH 7.3 และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. สารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) **ความเข้มข้น** 0.15 **โมลาร์** pH 7.2

NaCl	8.00 กรัม
KCl	0.20 กรัม
KH_2PO_4	0.20 กรัม
Na_2HPO_4	1.15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มล.

2. สารละลาย Blotto **ความเข้มข้น** 5%

Skimmed milk	5.00 กรัม
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0 มล.
Merthiolate 1% (Sigma)	1.00 มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.10 มล.

3. Merthiolate ความเข้มข้น 1%

Thimerosal (Sigma)	1.00 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มล.

ภาคผนวก ค

สารเคมีที่ใช้ในการผลิตไฮบริโดมา

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (RPMI medium)

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4 กรัม
D-glucose (Sigma)	3.60 กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923 กรัม
Sodium pyruvate ($C_3H_3O_3Na$) (Sigma)	1.1005 กรัม
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	2.0160 กรัม
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) (Sigma)	5.5925 กรัม
Penicillin G	20,000 units
Streptomycin G	200.0 มก.
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1,000.0 มล.

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มลจากนั้นผสมส่วนผสมจนเข้ากันดี ทำ .ให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่าน sterilized Millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่เสริมด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 20%

RPMI medium (1)	80.0 มล.
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)	20.0 มล.
100 x HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0 มล.

3. อาหารคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา (HAT medium)

เม็ดเลือดแดงจากหนูเมาส์ 1% ใน RPMI medium (1)	80.0 มล.
FBS RPMI medium (1)	20.0 มล.
100 x HT supplement RPMI medium (1)	1.0 มล.
50 x Aminopterin (Sigma) RPMI medium (1)	2.0 มล.

4. สารละลายเพื่อใช้ในการหลอมรวมเซลล์ (Polyethylene glycol ความเข้มข้น 40%)

Polyethylene glycol	5.0 กรัม
RPMI medium (1)	5.0 มล.

เติม RPMI medium (1) ลงใน Polyethylene glycol ที่ปราศจากเชื้อ บ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37ºC ก่อนนำมาใช้งาน

5. สารละลายเพื่อใช้ในการแช่แข็งเซลล์ไฮบริโดมา (Dimethyl sulfoxide ความเข้มข้น 12%)

Dimethyl sulfoxide (Sigma)	12.0 มล.
RPMI medium (1)	88.0 มล.

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4ºC ก่อนนำมาใช้งาน

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้ในงาน Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) **และ** Western blotting

1. Stock solution

1.1 สารละลายโมโนเมอร์ (30% T, 2.7% C_{Bis})

Acrylamide	58.4 กรัม
N, N'-methylene-bis-acrylamide	1.6 กรัม
น้ำกลั่น	200.0มล.

ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C

1.2 4x running gel buffer (tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3 กรัม
น้ำกลั่น	200.0 มล.

1.3 4X Stacking gel buffer (tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	3.0 กรัม
น้ำกลั่น	50.0 มล.

1.4 SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10%

Sodium dodecyl sulfate	50.0 กรัม
น้ำกลั่น	500.0 มล.

1.5 Ammonium persulfate ความเข้มข้น 10%

Ammonium persulfate	0.1 กรัม
น้ำกลั่น	1.0 มล.

1.6 Running gel overlay

Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ (1.2)	25.0 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	1.0 มล.
น้ำกลั่น	100 มล.

1.7 2x treatment buffer

Tris ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (1.3)	2.5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	4.0 มล.
Glycerol	2.0 มล.
β-mercaptoethanol	1.0 มล.
น้ำกลั่น	0.5 มล.

2. **การเตรียม** separating gel **และ** stacking gel

2.1 **การเตรียม** separating gel **สำหรับ** SDS-PAGE 15% gel (15% T2.7% C_{Bis})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	15.0 มล.
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3 มล.
น้ำกลั่น	0.75 มล.
10% Ammonium persulfate (1.5)	150.0 ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	20.0 ไมโครลิตร

2.2 **การเตรียม** stacking gel **สำหรับ** SDS-PAGE 4% gel (4% T2.7% C_{Bis})

สารละลายโมโนเมอร์ (1.1)	2.66 มล.
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	5.0 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.2 มล.
น้ำกลั่น	12.2 มล.
10% Ammonium persulfate (1.5)	100.0 ไมโครลิตร
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	10.0 ไมโครลิตร

ตาราง 9 ส่วนผสมพอลิอะคริลาไมด์ของ separating gel และ stacking gel

ส่วนผสม	Separating gel	Stacking gel
	15% T2.7% C_{Bis}	4% T2.7% C_{Bis}
30% T, 2.7% C_{Bis}	15 มล.	2.66 มล.
Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.8 (1.2)	7.5 มล.	-
Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.8 (1.3)	-	5 มล.
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	0.3 มล.	0.2 มล.
น้ำกลั่น	6.75 มล.	12.2 มล.
10% Ammonium persulfate (1.5)	150 ไมโครลิตร	100 ไมโครลิตร
(TEMED)	20 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร

3. Running buffer

3.1 SDS-PAGE Tank buffer

Tris	12.0 กรัม
Glycine	57.6 กรัม
SDS ความเข้มข้นความเข้มข้น 10% (1.4)	40.0 มล.
น้ำกลั่น	4,000.0 มล.

4. สารละลายย้อมโปรตีน และล้างสีส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Stain stock (สี Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 1%)

สี Coomassie blue R-250	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มล.

4.1.2 Stain (สี Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01%)

Stain stock	50.0 มล.
Methanol	250.0 มล.
Acetic acid	50.0 มล.
น้ำกลั่น	500.0 มล.

4.2 **สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน** (Destain)

4.2.1 **สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน** (Destain) 1

Methanol	550.0 มล.
Acetic acid	100.0 มล.
น้ำกลั่น	1000.0 มล.

4.2.2 **สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน** (Destain) 2

Methanol	50.0 มล.
Acetic acid	70.0 มล
น้ำกลั่น	1000.0 มล.

ทำการย้อมเจลโดยถอดเจลออกจากกระจก แช่ลงในสีย้อม Coomassie blue R-250 ความเข้มข้น 0.01% (4.1.2) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างสีส่วนเกินโดยนำเจลลงแช่ใน สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 1 (4.2.1) เขย่าเบาๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ย้ายเจลลงแช่ใน สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (Destain) 2 (4.2.2) จนสีพื้นของเจลใสปราศจากสี

5. Towbin transfer buffer pH 8.8 **เพื่อใช้ในการวิเคราะห์** Western blotting

Tris	3.03 กรัม
Glycine	14.4 กรัม
Methanol	200.0 มล.
น้ำกลั่น	800.0 มล.

แช่บัฟเฟอร์ให้เย็นจัดก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก จ

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ class และ Subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

1. Rabbit anti-Mouse IgG_1 (γ1 chain specific)

2. Rabbit anti-Mouse IgG_{2a} (γ2a chain specific)

3. Rabbit anti-Mouse IgG_{2b} (γ2b chain specific)

4. Rabbit anti-Mouse IgG_3 (γ3 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 IgG_1 (Mouse IgG_1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10% FBS)

11. Substrate buffer, concentrated (10x) (1M citrate, pH 4.2, containing 0.03% H_2O_2)

12. ABTS substrate, concentrated (50x) (2,2-azino-di (3-ethlbenzthiazoline sulfonic acid))

13. Blocking solution, concentrated (50x) (25% BSA and 0.05% NaN_3)

14. HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), concentrated (50x)

15. Goat anti- Mouse IgGAM, concentrated (50x) (0.5 mg/ml containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)

16. 50% Tween 20

ภาคผนวก ฉ

บัฟเฟอร์และสารเคมีในงาน Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%

Skimmed milk	5.0 กรัม
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0 มล.
Merthiolate 1% (Sigma)	1.0 มล.
Triton X-100 (Sigma)	0.1 มล.

2. สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 0.5%

สารละลาย Blotto ความเข้มข้น 5%	50.0 มล.
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	950.0 มล.

3. Citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5

Sodium citrate	29.41 กรัม
Merthiolate 1% (Sigma)	10.0 มล.
น้ำกลั่น	1000.0 มล.

ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

4. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N

Sulfuric acid	27.0 มล.
น้ำกลั่น	1000.0 มล.

5. O-Phenylenediamine (OPD)

ภาคผนวก ซ

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. coated slide solution

Gelatin	1.0 กรัม
$CrK(SO_4)_2.12H_2O$	50.0 มล.
น้ำกลั่น	100.0 มล.

2. Davidson's fixative

95% ethanol	30.0 มล.
100% formalin	20.0 มล.
Glacial acetic acid	10.0 มล.
น้ำกลั่น	30.0 มล.

3. Fetal bovine serum 10% ($P1^+$)

Fetal bovine serum	10.0 มล.
สารละลาย PBS ความเข้มข้น 0.15 M pH 7.2	100.0 มล.

4. สี Enrilich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8.0 กรัม
95% ethanol	400.0 มล.
Aluminium Potassium Sulphate	8.0 กรัม
Glycerine	400.0 มล.
Glacial acetic acid	400.0 มล.
น้ำกลั่น	400.0 มล.

5. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol

Eosin Y	0.2 กรัม
95% ethanol	100.0 มล.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นันต์ธวุฒิ พลภักดี
วัน เดือน ปี เกิด	26 สิงหาคม 2537
สถานที่เกิด	สุราษฎร์ธานี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2564 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ