

Abstract

Project Code : TRG5880246

**Project Title: Development of in-house ELISA for Bovine
Leukemia Virus (BLV) detection for Thai dairy industry**

**Investigator: Assistant Professor Dr. Manakorn Sukmak
Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University**

E-mail Address: fvetmksu@gmail.com

Project Period: 5 years

Keywords: Bovine leukemia virus, ELISA, Dairy

Bovine leukemia virus (BLV) causes neoplastic disease in cattle and causes economic losses in cattle production. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been widely used as the standard method for BLV detection. Here, we developed indirect ELISA by using four recombinant viral proteins i.e. i) p24, ii) gp51.1, iii) gp51.2 and iv) p24+gp51.1 to detect BLV antibodies. All viral protein was expressed by using an *E. coli* expression system, purified by the partial purify method and coated as an antigen for the Western blot analysis and ELISA test using previous reported BLV-positive serum. The p24 and p24+gp51.1 protein showed positive reaction in western blot analysis. Unfortunately, the

recombinant proteins gp51.1 and gp51.2 were not showed any reaction to BLV positive antibody in Western blot analysis. Thus, we selected p24 protein and p24+gp51.1 to continue with chequerboard titration test and both protein showed good performance with this test. However, the positive reaction good performance of p24+gp51.1 protein may cause by the reaction to p24 protein. Finally, the p24-ELISA was selected for further analysis. We used the two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) for cut-off optimization and evaluation for 385 field samples and compared the results with a commercial BLV-ELISA kit. The p24-ELISA provided the best correlation with the commercial kit (Sensitivity = 90.94%, Specificity = 96.66%). In conclusion, the p24-ELISA provided the best performance to detect BLV antibodies, with high sensitivity and specificity. In this study, we have proved that gp51 protein could not be used as an antigen for antibody detection by ELISA. Finally, we hope that our in-house ELISA can be useful as a routine screening test for BLV detection in dairy industry.

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่: TRG5880246

ชื่อโครงการ: การพัฒนาชุดทดสอบโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในโค (bovine leukemia virus) ด้วยวิธี ELISA สำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยง วัวนม

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.

มานะกร สุขมาก

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การติดต่อทางไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: fvetmksu@gmail.com

ช่วงเวลาการวิจัย: 5 ปี

คำหลัก: มะเร็งเม็ดเลือดขาวในวัว, ELISA, วัวนม

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในวัว หรือ Bovine leukemia virus (BLV) เป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดมะเร็งในเม็ดเลือดในวัว เป็นโรคติดเชื้อไวรัสที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพวัวและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตนํ้านม วิธีการคัดกรองการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จึงเป็นสิ่งสำคัญซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) เป็นวิธีการมาตรฐานในการตรวจสอบในงานวิจัยนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการพัฒนาชุดทดสอบโรคด้วยวิธี ELISA เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส โดยผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein) ของไวรัส 4 ชนิดในกระบวนการพัฒนา ได้แก่ 1) โปรตีน p24 2) โปรตีน gp51.1 3) โปรตีน gp51.2 และ 4) โปรตีน p24 ผสมกับ gp51.1

โปรตีนลูกผสมในการวิจัยถูกผลิตโดยใช้ระบบผลิตโปรตีนโดยอาศัยเซลล์เจ้าบ้านเป็น *E.coli* และถูกทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการทำให้บริสุทธิ์แบบ partial purification ก่อนการนำไปวิเคราะห์ต่อวิธี Western blot analysis และ ELISA โดยใช้ตัวอย่างซีรัมวัวที่เคยทดสอบและให้ผลบวกต่อโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในวัว

โปรตีนลูกผสม p24 และ p24+gp51.1 ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี western blot analysis ในขณะที่ โปรตีนลูกผสม gp51.1 และ gp51.2 ให้ผลเป็นลบ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเลือกโปรตีน p24 และ p24+gp51.1 เพื่อ

ดำเนินการทดสอบในขั้นต่อไปด้วยวิธี chequerboard titration test โดยโปรตีนทั้งสองชนิดให้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพึงพอใจ อย่างไรก็ตามผลบวกที่ปรากฏต่อโปรตีน p24+gp51.1 น่าจะเกิดจากอิทธิพลของโปรตีน p24 เป็นหลัก ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการเลือกโปรตีน p24 มาพัฒนาเป็น ELISA และทดสอบเปรียบเทียบกับชุดทดสอบในท้องตลาดในขั้นตอนต่อไป

คณะผู้วิจัยหาค่า cut-off ของชุดทดสอบด้วยวิธี two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) โดยใช้ตัวอย่างวัวทั้งสิ้น 385 ตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากชุดทดสอบในท้องตลาด โดย p24-ELISA ที่คณะผู้วิจัยพัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการทดสอบโรคได้สอดคล้องกับชุดทดสอบที่มีขายในท้องตลาดโดยมีค่า Sensitivity เท่ากับ 90.94% และ Specificity เท่ากับ 96.66%

โดยสรุปแล้วจากโปรตีน 4 ชนิดที่ผู้วิจัยทำการผลิตและทดสอบคุณสมบัติในการตรวจโรค พบว่ามีเพียงโปรตีน p24 ที่สามารถต่อยอดมาใช้พัฒนาเป็นชุดทดสอบ ELISA ได้ โดยให้ค่า Sensitivity และ Specificity อยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าโปรตีน gp51 (ทั้ง gp51.1 และ gp51.2) ไม่สามารถใช้เป็นโปรตีนในการตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ได้ สุดท้ายนี้ทางคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าชุดทดสอบโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวในวัวที่ทางผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมาจะเป็นประโยชน์ต่อการคัดกรองโรคนี้ต่อการอุตสาหกรรมการผลิตวัวนมต่อไปในอนาคต