

Detection of lumpy skin disease virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using immunohistochemistry and indirect immunofluorescence assay

Vara Varong* Peerada Siriwattharawong

Abstract

Background: Lumpy skin disease (LSD) is a disease caused by the Lumpy skin disease virus (LSDV). This virus causes fever and the formation of skin nodules, mucosal lesions, and internal organ damage, resulting in significant losses in livestock. The diagnosis of LSD can be performed using PCR, ELISA, and histopathology. However, in some cases, additional techniques such as IHC and IFAT are necessary due to limitations of samples preserved in formalin. Therefore, the objective of this study was to produce a specific primary antibody for LSDV by expressing recombinant protein and expanding the capabilities and options for disease diagnosis.

Method: The p32 gene was amplified by PCR to increase the genetic material and cloned into a cloning vector, followed by subcloning into an expression cloning vector. The molecular weight of the recombinant protein p32 was confirmed through SDS-PAGE and western blotting. The p32 gene was sequenced and aligned to test its identity. Then, the antiserum obtained from immunized mice was tested against positive and negative samples using IHC and IFAT techniques.

Result: The experiments showed that the genetic material of LSDV, particularly the p32 gene, could be amplified successfully. Moreover, the recombinant p32 protein could be expressed in *E. coli* and the antiserum could be used in IHC and IFAT techniques for 16 samples. Additionally, the nucleotide sequence of p32 was closely related to the nucleotide sequence of the virus found in China.

Conclusion: The use of IHC and IFAT techniques expands the options for LSD diagnosis, allowing for the examination of samples preserved in formalin. This enhances the capabilities and expands the options of laboratory services, reducing the limitations of shortages or the need to import antibodies from foreign countries.

Keywords: Lumpy skin disease virus, Immunohistochemistry and Indirect immunofluorescence assay

National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author. Tel; Fax: 02 579 8918; E-mail: v_varong@hotmail.com

Received: 8 October 2025

Revised: 15 December 2025

Accepted: 15 December 2025

การตรวจไวรัสลัมปี สกิน ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินด้วยเทคนิค immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

วรา วรงค์* พีรดา ศิริวัชรวงค์

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: Lumpy skin disease (LSD) เป็นโรคที่เกิดจาก Lumpy skin disease virus (LSDV) ไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิด ไข้ พบตุ่มที่ผิวหนัง เยื่อเมือก และอวัยวะภายใน สร้างความสูญเสียแก่ปศุสัตว์ของประเทศ การตรวจวินิจฉัยโรค LSD สามารถทำได้โดยวิธี PCR, ELISA และ จุลพยาธิวิทยา อย่างไรก็ตามพบว่าหลาย ๆ กรณีมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคทาง IHC และ IFAT เนื่องจากข้อจำกัดของตัวอย่างที่ถูกแช่ในฟอร์มาลิน แต่การชันสูตรโรคด้วยเทคนิค IHC และ IFAT มีความจำเป็นต้องใช้ primary antibody ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต primary antibody ที่จำเพาะต่อ LSDV โดยอาศัยการแสดงออกของ recombinant protein เพื่อเพิ่มศักยภาพและทางเลือกในการวินิจฉัยโรคให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วิธีการ: เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ p32 โดย PCR เพื่อ clone เข้าสู่ cloning vector และ subclone เข้าสู่ expression cloning จากนั้นตรวจสอบ molecular weight ของ recombinant protein p32 ด้วย SDS-PAGE และ western blot เพื่อยืนยัน p32 gene ได้ผ่านการ sequencing และ alignment เพื่อทดสอบ identity จากนั้นนำ antiserum ที่ผ่านการการฉีดหนู มาทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกและลบด้วยวิธี IHC และ IFAT

ผล: จากการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ LSDV ส่วน p32 gene ได้ นอกจากนี้ยังสามารถแสดงออกของโปรตีนลูกผสมของ p32 ใน *E coli* ได้ ซึ่งสามารถนำ antiserum มาใช้ในการตรวจด้วยวิธี IHC และ IFAT จำนวนทั้งหมด 16 ตัวอย่างได้ นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ p32 มีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสที่พบในประเทศจีน

สรุป: สามารถเพิ่มทางเลือกการชันสูตรของโรค LSD ได้จากการใช้เทคนิค IHC และ IFAT ทำให้สามารถตรวจตัวอย่างที่ถูกแช่ในฟอร์มาลินได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพและขยายความสามารถของห้องปฏิบัติการเพื่อการให้บริการและลดข้อจำกัดของการขาดแคลนหรือจำเป็นต้องสั่งซื้อแอนติบอดีจากต่างประเทศได้

คำสำคัญ: ไวรัสลัมปี สกิน, immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร โทรสาร: 02 579 8918, อีเมล: v_varong@hotmail.com

บทนำ

Lumpy skin disease (LSD) เป็นโรคที่เกิดจาก Lumpy skin disease virus (LSDV) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Poxviridae สกุล Capripoxvirus ไวรัสชนิดนี้ก่อโรคในโค กระบือ แพะ และแกะ โดยสัตว์ที่ติดเชื้อมีไข้ ชูบผอม น้ำหนักลด แท้ง ต่อมน้ำเหลืองขยายขนาด ปริมาณน้ำนมลดลง บวมที่ผิวหนัง พบตุ่มที่ผิวหนัง เยื่อเมือก และอวัยวะภายใน และบางครั้งทำให้สัตว์ตายได้ ในพ่อแม่พันธุ์พบภาวะเป็นหมันแบบชั่วคราวหรือถาวร ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและการทำวัคซีนเพื่อป้องกันโรค จึงสร้างความเสียหายแก่ปศุสัตว์ของประเทศ (Namazi and Tafti, 2021) โรคนี้มีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทยที่เริ่มพบการระบาดครั้งใหญ่ใน ปีพ.ศ. 2564–2565 ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรจำนวนมาก จึงต้องมีวิธีการวินิจฉัยที่รวดเร็วและแม่นยำ (Seerintra et al., 2022)

การตรวจวินิจฉัยโรค LSD ด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา มักพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ผิวหนังชั้น epidermis ร่วมกับ rete ridge formation และการเสื่อมแบบมีช่องว่างของเซลล์ผิวหนังชั้น epidermis, acanthosis, การเสื่อมแบบ ballooning degeneration ของ keratinocytes, intracytoplasmic intracellular inclusion bodies, histiocytic inflammation ของผิวหนังชั้น dermis และ fibrinonecrotic vasculitis (Gupta et al., 2020) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคอื่น ๆ เช่น pseudo-lumpy skin disease, besnoitiosis, demodicosis, bovine papular stomatitis, dermatophilosis, vesicular stomatitis, cutaneous tuberculosis และ ringworm อาจทำให้ไม่สามารถระบุสาเหตุของการเกิดโรคได้อย่างชัดเจน อีกทั้งตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจเพื่อหาสาเหตุของโรคเหล่านี้ มักถูกใช้ในฟอร์มาลินซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล คือ polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิค immunohistochemistry (IHC) เป็นวิธีที่สามารถระบุเชื้อในเนื้อเยื่อที่แช่ฟอร์มาลินได้ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ LSDV (primary antibody) จับกับเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ของตัวอย่างชิ้นเนื้อส่งตรวจ แล้วอาศัยหลักการตกตะกอนของสี substrate ที่ติดกับ secondary antibody ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อภายในเซลล์ได้ ซึ่งเป็นหลักการเดียวกับเทคนิค indirect immunofluorescence assay (IFA) โดยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อจำเป็นต้องมีการตอบสนองของแอนติบอดีต่อแอนติเจน (antigenicity) สูง ซึ่งสามารถเตรียมได้จากเชื้อไวรัสที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่ได้มักพบปัญหาการเกิด nonspecific reaction จึงต้องทำเชื้อไวรัสที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ก่อนแล้วจึงนำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดี และมีความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ดังนั้นการใช้โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) จึงเป็นทางเลือกในการลดปัญหาดังกล่าว โดยมีการศึกษาพบว่าโปรตีนลูกผสม p32 (recombinant p32 protein) ซึ่งผลิตจากโปรตีนโครงสร้างส่วนเปลือกหุ้ม (envelope protein) ของเชื้อไวรัส goatpox สามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเชื้อ LSDV ด้วยวิธี ELISA ได้ (Ebrahimi-Jam et al., 2021) เนื่องจากโปรตีนลูกผสม p32 มีความเป็น antigenicity สูง จึงสามารถใช้สำหรับกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะ แม้ว่าการชันสูตรโรค LSD ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แช่ในฟอร์มาลินด้วยเทคนิค IHC และ IFA โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตโดยโปรตีนลูกผสม p32 ยังไม่แพร่หลาย (Lubinga et al., 2014) และยังไม่มียางานในประเทศไทย ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือการประยุกต์ใช้เทคนิค IHC และ IFA สำหรับการชันสูตรโรค LSD ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ด้วยแอนติบอดีที่ผลิตจากโปรตีนลูกผสม p32 เพื่อระบุการติดเชื้อ LSDV จากรอยโรคที่พบในตัวอย่างชิ้นเนื้อ และยังเป็นการเพิ่มศักยภาพห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

จริยธรรมการทดลอง

สัตว์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับการดำเนินการตามหลักการดูแลและใช้สัตว์วิจัย โดยได้รับการอนุมัติโครงการจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ อนุญาตหมายเลข EA-006/66(R) ครอบคลุมการใช้หนูเป็นสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างควบคุมบวกและลบ

ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากผิวหนังโคที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน จำนวน 16 ตัวอย่าง จากเขตภาคกลางของประเทศ ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่มีลักษณะ ballooning degeneration แต่ไม่พบ inclusion body จากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาและให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีลักษณะปกติและให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยวิธี IHC และ IFA

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ p32 ด้วยวิธี PCR

สกัด DNA จาก LSDV โดยใช้ชุด QIAamp DNA Kit (QIAGEN, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน p32 (M1-I322aa) โดยการออกแบบ primers จากข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของ LSDV ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. ON152411) ที่จำเพาะต่อสารพันธุกรรมของยีน p32 และแสดงออกใน prokaryotic system โดยการทำให้ PCR (T100 thermal cycler, Bio-Rad, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 25 μ L ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่ไม่มี Mg^{2+} 0.2 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M ของ primers (ตารางที่ 1), 5 μ L ของ template DNA, 1 ยูนิตของ Platinum™ Tag DNA polymerase (Invitrogen, USA) ซึ่งมีสภาวะการทดสอบ ดังนี้ denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C

ตารางที่ 1. โพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (5' to 3')

primer	Sequence	ขนาด
forward	ataGGATCCATGGCAGATATCCATTATATGTTATAC-CAATCGTT (BamHI)	969 bp
reverse	attAAGCTTAAATTATACGTAATAACATACCTGCTA-AAAACCATAGTAATTTAGA (HindIII)	

เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 °C เป็นเวลา 1.5 นาทีและ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำ PCR products ไปวิเคราะห์ที่ 1% agarose และอ่านภายใต้ UV (Gel Doc™ XR, Bio-Rad, USA)

การผลิต recombinant p32 protein

นำ PCR product ที่เพิ่มจำนวนแล้วนำมา ligate กับ vector pGEM-TEasy จากนั้นหา positive clone ด้วย blue-white colonies และการย่อยด้วยเอนไซม์ BamHI และ HindIII (Takara, Japan) และทำ sequencing จากเชื้อเอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) positive clones ที่มี pGEM-Teasy_p32 และนำมาเลี้ยง 5 mL และสกัดพลาสมิดเวกเตอร์ (Promega®, USA) เพื่อส่งบริษัทสำหรับหาลำดับพันธุกรรม s จากนั้นนำมา subclone เข้ากับเวกเตอร์ pET24a+ โดยใช้ T4 DNA ligase (Takara, Japan) และคัดเลือกโดยเฉพาะเชื้อใน LB medium ที่มีการใส่ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL และหา positive clone โดย colony PCR ต่อมาพลาสมิดที่ได้จะถูกสกัดด้วยชุด Miniprep plasmid isolation kit (Roche, Germany) พลาสมิดถูก transformed เข้าสู่ *E. coli* BL21DE3 และเพาะเชื้อบนแผ่นเชื้อ LB ที่มีการใส่ kanamycin (100 μ g/mL) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นเชื้อจะถูกเพิ่มลงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C โดยเริ่มต้นด้วยการเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm จนกว่าจะเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตของการเพาะเชื้อ (OD600 = 0.6-0.9) และเติม Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 mM ลงไป และเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็ว 200 rpm นานข้ามคืน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ *E. coli* โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา

15 นาที ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ทำโปรตีนลูกผสมที่ได้ ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA agarose (Qiagen, Germany) เพื่อเก็บโปรตีนซึ่งจะเป็นส่วนใส และนำไปวิเคราะห์บนเจล SDS-PAGE ขนาด 10%

SDS PAGE และ Western blot

ทำการวิเคราะห์ที่ purified recombinant p32 เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในเจล SDS-PAGE ขนาด 10% เมื่อแยก recombinant protein ใน SDS PAGE แล้ว จากนั้นส่งถ่าย recombinant p32 ที่ได้ไปยังเมมเบรน nitrocellulose และตรวจหาโปรตีนโดยใช้ซีรัมโคที่ติดเชื้อ 1:250 และ Goat anti-Bovine IgG (H+L), HRP (Thermoscientific, USA) 1:6000 เมื่อตรวจพบแล้วก็จะนำลือตไปทำให้เกิดสีโดยใช้ substrate ของ 3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)

การผลิต mouse anti recombinant p32 antibody

ใช้หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศผู้ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 5 ตัว ในการฉีดทางช่องท้อง โดยฉีดตัวละ 25 ไมโครกรัมต่อตัวหนู โดยฉีดทั้งหมด 4 ครั้ง โดยมีช่วงห่างของการฉีดวัคซีนเป็น 10 วัน ทำการเก็บเลือดจากหางเพื่อเก็บเซรัม โดยในวันแรกที่ฉีดใช้ Freund's complete adjuvant ผสมกับ rP32 ที่ผลิตได้ ครั้งที่สองจึงฉีดด้วย Freuds incomplete adjuvant ผสมกับ rP32 ที่ผลิตได้ ทำการเก็บเลือดหลังจากฉีดครั้งสุดท้าย

การตรวจตัวอย่างทางจุลพยาธิวิทยา immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

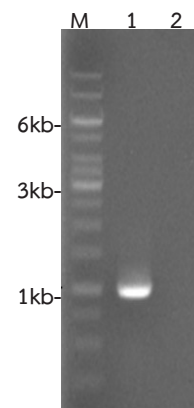
ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ถูกฝังในพาราฟิน ตัดขนาด 3-5 ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างมาย้อมสีด้วยสาร hematoxylin และ eosin นอกจากนี้การย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ เมื่อผ่านกระบวนการตัดแล้ว ตัวอย่างจะถูก dewaxed ใน xylene, และ rehydrated ล้างด้วยสารล้าง Tris buffer solution และกำจัด H₂O₂ ใน cells ด้วย 3% H₂O₂ ใน methanol จากนั้นตัวอย่างจะถูกนำไป block ด้วยซีรัมแพะเพื่อป้องกัน nonspecific binding

จากนั้น incubate ด้วย mouse anti-LSDV p32 antibodies ที่มีอัตราส่วนการเจือจาง 1:100 จากตัวอย่าง จะถูกล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer (0.05% PBST) ครั้งจากนั้นเติม Envision anti-mouse HRP (Dako, USA) 1: 5,000 แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หลังจากล้าง 3 ครั้ง เติม DAB substrate เพื่อให้เกิดสี ในขณะที่ IFAT ใช้ secondary antibody ชนิด goat anti-mouse Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen™, USA) อ่านและวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยเทคนิค IHC จากการติดสี DAB และเทคนิค IFAT จากการเรืองแสง Fluorescent เพื่อหาความจำเพาะของ primary antibody ตัวอย่าง positive control คือตัวอย่างสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR ส่วนตัวอย่าง Negative control คือตัวอย่างสัตว์ที่ให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR ดังหัวข้อตัวอย่างควบคุมบวกและลบ

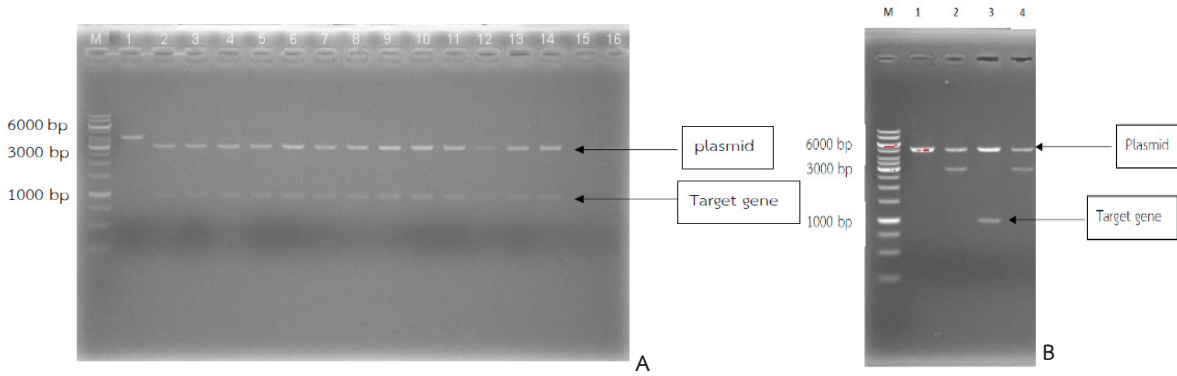
ผลและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ p32 ด้วยวิธี PCR

PCR product ที่เพิ่มจำนวนขึ้นด้วย primers ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel (รูปที่ 1) ได้ขนาดประมาณ 969 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ebrahimi-Jam et al. (2021) ที่ใช้ยีน p32 ในการผลิตโปรตีนลูกผสมเพื่อใช้เป็นแอนติเจนใน ELISA แสดงให้เห็นว่าการออกแบบไพรเมอร์และสภาวะ PCR มีความเหมาะสมเพียงพอสำหรับการขยายยีนนี้ในตัวอย่างที่ใช้ในประเทศไทย



รูปที่ 1 amplified PCR product ของ p32 หมายถึง M คือ 1Kb DNA ladder Lane 1 คือ amplified PCR product ของ p32 มีขนาด 969 bp Lane 2 คือ negative control



รูปที่ 2 ผลการทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1Kb DNA ladder marker เพื่อตรวจสอบ p32 พบแถบ positive gene ขนาดประมาณ 1,000 bp จาก 13 โคลนี ซึ่งแถบขนาด 3,000 bp คือ pGEM T-easy vector (A) ผลการทำ gel electrophoresis โดยใช้ 1 kb DNA ladder marker พบแถบ positive gene จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 1,000 bp ซึ่งแถบขนาด 5,900 bp คือ pET-24a vector (B)

ผลการโคลนยีนเข้าสู่ pGEM T-easy vector และ ผลการ subclone เข้า pET-24a vector

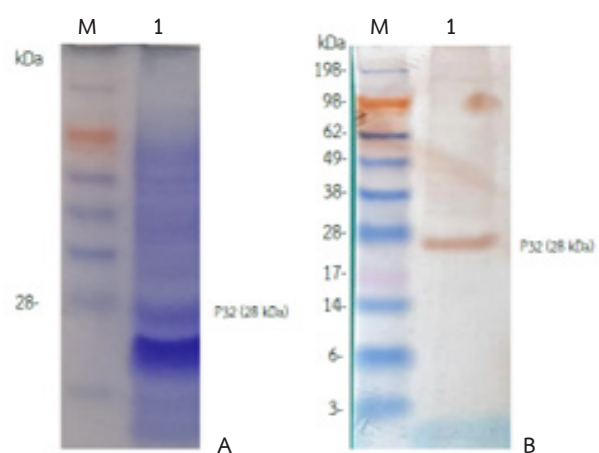
ผลจากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ p32 เข้ากับ pGEM T-easy vector พบว่า ดีเอ็นเอของ p32 ถูกเชื่อมต่อกับ pGEM T-easy vector (A) และสามารถ transformation เข้าสู่ competent *E. coli* cells ได้ และสามารถ subclone เข้าสู่ pet 24 a ได้ (B) แสดงว่ากระบวนการโคลนยีนและการย้ายยีนเข้าสู่เวกเตอร์แสดงออกประสบความสำเร็จ

SDS PAGE และ Western blot

การแสดงผลของ rP32 พบว่ามีแถบโปรตีนมีขนาดโมเลกุลประมาณ 28 kDa ด้วย SDS-PAGE เมื่อตรวจสอบ ด้วย western blot ผลชี้ให้เห็นว่าพบโปรตีนน้ำตาแลซมีขนาดประมาณ 28 kDa ในขณะที่การทดลองของ Tursunov et al., 2022 ได้ recombinant p32 มี molecular weight ประมาณ 30 kDa ซึ่งการที่โปรตีนที่ผลิตได้มีขนาดเล็กกว่าที่รายงานน้ำหนักโมเลกุลของ rP32 ประมาณ 30 kDa เล็กน้อย ความแตกต่างของขนาดโปรตีนนี้อาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ระบบการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อรูปแบบการพับตัว (protein folding), ความเสถียรของโปรตีน และความยาวของผลิตภัณฑ์การแปลรหัส เนื่องจากสายพันธุ์ *E. coli* แต่ละชนิดอาจมีประสิทธิภาพในการแสดงออกและพับโปรตีนแตกต่างกัน (Rosano and Ceccarelli, 2014).

นอกจากนี้ ความแตกต่างของ tag sequence ที่ใช้ในเวกเตอร์ เช่น His-tag ของ pET24a ซึ่งมีความยาวหรือโครงสร้างไม่เท่ากับระบบของ Tursunov อาจทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่างกันได้ (Terpe, 2003).

อีกประเด็นคือ ความเป็นไปได้ของ post-translational modification (PTM) หรือการคงอยู่ของ signal peptide, leader peptide หรือ peptide fragment เล็ก ๆ แม้ *E. coli* โดยทั่วไปจะไม่มี PTM แบบยูคาริโอต แต่การเกิด proteolytic cleavage หรือการไม่ถูกตัด signal peptide อาจทำให้โปรตีนมีขนาดต่างออกไปเล็กน้อยได้ (Walsh, 2010).



รูปที่ 3 การทำ SDS-PAGE(A) และ western blot (B) โดยมีเลน M เป็นตัวอ้างอิงขนาดโปรตีน (Bio-Helix, Taiwan) และเลน 1เป็น rP32 ตามลำดับ

การจัดเรียงลำดับ (Sequence Alignment) ของ p32

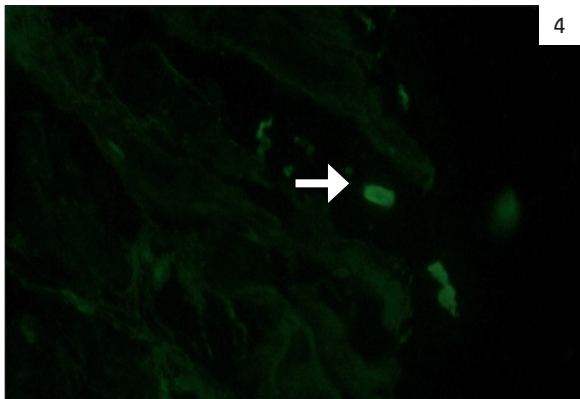
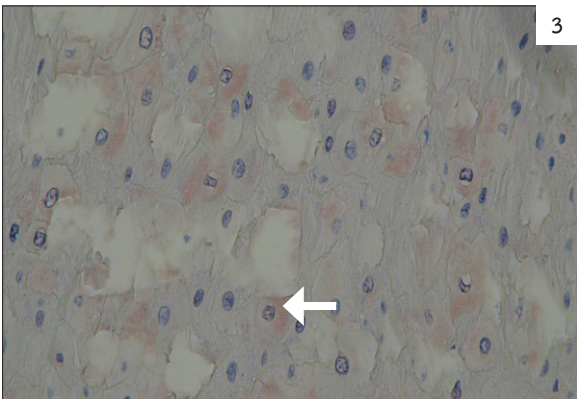
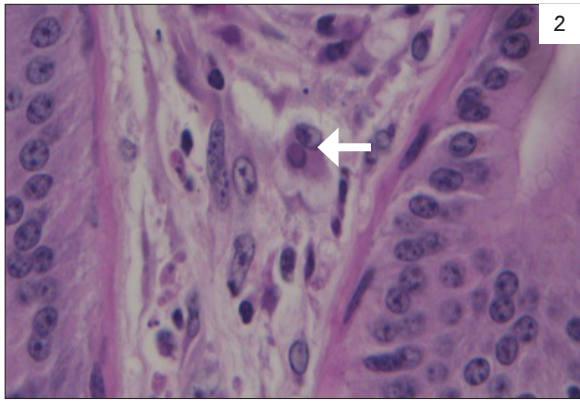
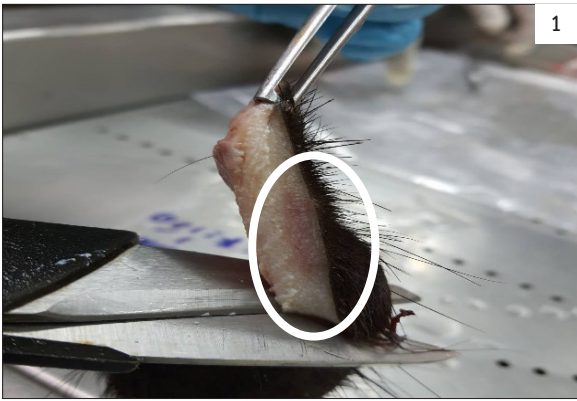


ผลจากการทำ sequence alignment พบว่า p32 gene ที่ได้มีความเหมือนกับ Lumpy skin disease virus isolate LSDV/Xinjiang/2019 envelope protein (p32) gene, complete cds ที่ 96.69% identity และเหมือนกับ Lumpy skin disease virus strain Neethling-Herbivac vaccine ที่ 99.46% ซึ่งผลที่ได้เหมือนกันกับการทดลองที่พบโดย Seerintra et al., 2022 ซึ่ง p32 gene เหมือนกันกับ p32 ของ LSDV ที่มีระบาดในประเทศจีน ซึ่งให้เห็นว่าการเลือกใช้ชิ้น p32 ในการผลิตโปรตีนลูกผสมนั้นเหมาะสมต่อการตรวจวินิจฉัยสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

จุลพยาธิวิทยา immunohistochemistry และ indirect immunofluorescence assay

จากผลทางจุลพยาธิวิทยาที่พบโดยงานวิจัยนี้มีลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่คล้ายกับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่พบโดย (Gharban et al., 2019)

เช่น Inflammatory cell infiltration in dermis, intracytoplasmic inclusion bodies with Vacuolation of granulocytes and Hyperkeratosis โดยจำนวน 16 ตัวอย่างทั้งหมดประกอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 10 ตัวอย่างให้ผลบวกด้วย IHC และ IFAT ทั้งหมด และตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ LSDV ด้วยวิธี PCR จำนวน 6 ตัวอย่างพบว่าให้ผลลบต่อ IHC และ IFAT ทั้ง 6 ตัวอย่าง แสดงถึงความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของแอนติบอดีที่ผลิตจากหนูทดลองอยู่ในระดับที่น่าพอใจ แม้ว่าในงานนี้ จะยังไม่ได้ประเมิน sensitivity และ specificity ในเชิงสถิติ แต่ความสอดคล้องของผล 100% ทั้ง 16 ตัวอย่าง ถือเป็นจุดเด่นของการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามควรพิจารณาว่าเป็นขนาดตัวอย่างที่ยังค่อนข้างจำกัด และงานนี้ยังไม่ประเมินการ cross-reactivity ของแอนติบอดีกับเชื้อ Capripoxvirus อื่น เช่น goatpox หรือ sheeppox ซึ่งมีโครงสร้างโปรตีน p32 ใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4 ก้อนผิวหนังในโคที่เป็นโรค (1) การตัดชิ้นเนื้อก้อนผิวหนังเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. พบ hemorrhagic subcutis (วงกลม) จุฬพยาบาลสัตวศาสตร์ (2) พบ intracytoplasmic inclusion body ที่ cells ในชั้น dermis IHC ดำเนินเนื้อเยื่อชั้น dermis (3) พบ swelling และ vacuolation โดยที่ reaction ของ substrate AEC พบใน cytoplasm และ counterstained ด้วย hematoxylin immunofluorescent (4) แสดงผลการเรืองแสง green fluorescent ของ cell ที่ติดเชื้อไวรัส

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของยีน p32 ได้สำเร็จและผลิตโปรตีนลูกผสมในระบบโปรคาริโอตได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งโปรตีนดังกล่าวสามารถกระตุ้นหนูทดลองให้สร้าง antiserum ที่นำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค IHC และ IFAT ได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ลำดับพันธุกรรมของ p32 ที่ได้ยังมีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ของเชื้อที่มีการระบาดในประเทศจีน ซึ่งสนับสนุนความเหมาะสมของตำแหน่งยีนที่เลือกในการใช้เป็นแอนติเจน การนำยีนที่มีคุณสมบัติด้าน antigenicity สูงมาแสดงออกในระบบโปรคาริโอตจึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการผลิต immunogen สำหรับสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อการตรวจโรค LSD ซึ่งจะช่วยลดการพึ่งพาการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศ และเพิ่มความหลากหลายของวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ห้องปฏิบัติการสามารถให้บริการได้

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ ขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของแอนติบอดีค่อนข้างน้อย ทำให้ไม่สามารถสรุปผลในระดับที่ครอบคลุมได้ทั้งหมด อีกทั้งแอนติบอดีที่ผลิตเป็นชนิด polyclonal ซึ่งอาจมีความแปรผันระหว่างชุดการผลิต และยังไม่มีการประเมินการเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) กับไวรัสในสกุล Capripoxvirus อื่น เช่น goatpox และ sheeppox จึงควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อตรวจสอบความจำเพาะและความไวในระดับเชิงปริมาณ รวมถึงการประเมิน cross-reactivity อย่างเป็นระบบ

ในอนาคต แอนติบอดีที่ผลิตได้อาจถูกพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจวินิจฉัยในรูปแบบอื่น เช่น ELISA เพื่อใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองโรคในกลุ่มตัวอย่างที่หลากหลายมากขึ้น พร้อมทั้งควรมีการทดสอบในประชากรตัวอย่างขนาดใหญ่เพื่อยืนยันความแม่นยำก่อนนำไปใช้ในงานวินิจฉัยเชิง routine ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ สพ.ญ. ณัฐกานต์ สุวรรณกิจวัฒน์
ในการสนับสนุนสารพันธุกรรมของเชื้อและคำแนะนำใน
การเลือกยีนเพื่อการแสดงออกของโปรตีนเพื่อการชันสูตร

เอกสารอ้างอิง

- Ebrahimi-Jam, M.H., Keyvanfar, H., Varshovi, H.R., Seyfi Abad Shapoori, M.R., and Lotfi, M., 2021. Development and Evaluation of an Indirect Capripoxvirus ELISA Based on Truncated p32 Protein Expressed in *E. coli*. *Arch Razi Inst* 76: 471–485.
- Gharban, H.A.J., Al-Shaeli, S.J.J., Al-Fattli, H.H.H., and Altaee, M.N.K., 2019. Molecular and histopathological confirmation of clinically diagnosed lumpy skin disease in cattle, Baghdad Province of Iraq. *Vet. World*. 12(11): 1826–1832.
- Gupta, T., Patial, V., Bali, D., Angaria, S., Sharma, M., and Chahota, R., 2020. A review: Lumpy skin disease and its emergence in India. *Vet. Res. Commun.* 44(3-4): 111–118.
- Lubinga, J.C., Tuppurainen, E.S.M., Coetzer, J.A.W., Stoltz, W.H., and Venter, E.H., 2014. Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. *Exp. Appl. Acarol.* 62(1): 67–75.
- Namazi, F., and Tafti, A.K. 2021. Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review. *Vet. Med. Sci.* 7(3): 888–896.
- Rosano, G.L., and Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5:172.
- Seeritra, T., Saraphol, B., Wankaew, S., and Piratae, S., 2022. Molecular identification and characterization of Lumpy skin disease virus emergence from cattle in the northeastern part of Thailand. *J. Vet. Sci.* 23(5): e73.
- Terpe, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(5): 523–533.
- Tursunov, K., Tokhtarova, L., Kanayev, D., Mustafina, R., and Mukantayev, K., 2022. Effect of thioredoxin on the immunogenicity of the recombinant p32 protein of Lumpy skin disease virus. *Vet. World.* 15(10): 2384–2390.
- Walsh, C.T. 2010. Post-translational modification of proteins: expanding nature's inventory. Colorado: Roberts and Company. 350 pp.