AVIAN INFLUENZA VIRUS RECOMBINANT PROTEIN (H5N1): IMMUNOGENICITY

TANANUN SIHATRAKUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)
FALCULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ RECOMBINANT โปรตีนจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (AVIAN INFLUENZA VIRUS RECOMBINANT PROTEIN (H5N1): IMMUNOGENICITY)

ธนานันต์ สีห์ตระกูล 4736626 SIMI/M
วท.ม (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: รวงผึ้ง สุทเธนทร์, M.D., Ph.D., วรรณี กัณฐกมาลากุล, Ph.D.,
สนทนา ศิริตันติกร, Dr.rer.nat

บทคัดย่อ

Influenza virus type A ทำให้เกิดการติดเชื้อในคนและสัตว์หลายชนิด มีการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกชนิด H5N1 และมีการติดเชื้อในคน เป็นครั้งแรกในฮ่องกงในปี 2540 ในเดือนมกราคม 2550 องค์การอนามัยโลกรายงานการติดเชื้อ H5N1 ในคนทั่วโลกเป็นจำนวน 270 ราย โดยมีอัตราการเสียชีวิต 60% การระบาดของโรคไข้หวัดนกทั่วโลกทำให้เกิดความจำเป็นในการพัฒนาวัคซีน Hemagglutinin (HA) และ Nueraminidase (NA) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนเปลือก เป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นวัคซีนเพราะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน กระบวนการผลิตวัคซีนมีความปลอดภัย ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้ recombinant protein ชนิด HA และ NA ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการสร้างวัคซีนต่อไป

Recombinant protein ชนิด HA5 (rHA5) ขนาด 63 kDA และ NA1 (rNA) ขนาด 55 kDAของไวรัสไข้หวัดนกได้ถูกผลิตใน prokaryotic system โดยใช้ pBAD/His expression vector ได้สำเร็จ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ recombinant protein ชนิด rHA5 และ rNA1 ที่ถูกผลิตขึ้นนั้นถูกทดสอบในหนูชนิด BALB/C antibody titer ที่ระดับ1:100 และ 1:5 ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหนูโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Indirected Immunofluorescence Assay (IFA) ตามลำดับ จากการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันพบว่า rHA5 สามารถกระตุ้นระดับภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า rNA1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนการตอบสนองของ neutralizing antibody ของหนูที่วัดด้วยวิธี neutralization assay พบว่ามีระดับต่ำที่ระดับ antibody titer 1:50

การศึกษาในครั้งนี้พบว่า recombinant protein ชนิด rHA5 และ rNA1 มีสามารถกระตุ้น neutralizing antibody ในสัตว์ทดลอง และอาจเหมาะสมเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับไวรัสไข้หวัดนก โดยในอนาคตควรมีการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ recombinant protein ชนิด rHA5 และ rNA1 ใน eukaryotic system และการศึกษา epitope ส่วนที่กระตุ้นให้เกิดการสร้าง neutralizing antibody เพิ่มเติม รวมถึงการเลือกใช้ สายพันธุ์ของไวรัสให้ถูกต้อง เนื่องจาก neutralizing antibody มีความจำเพาะต่อทั้งสัปทัยป์ และ สายพันธุ์

110 หน้า

AVIAN INFLUENZA VIRUS RECOMBINANT PROTEIN(H5N1): IMMUNOGENICITY

TANANUN SIHATRAKUL 4736626 SIMI/M
M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: RUENGPUNG SUTTHENT, M.D., Ph.D., WANNEE KANTAKAMALAKUL, Ph.D., SONTANA SIRITANTIKORN, Dr.rer.nat.

ABSTRACT

Influenza A virus causes infection in a variety of animal species including humans. The first outbreak of avian influenza (H5N1) virus in a human occurred in Hong Kong in 1997. As of Jan 2007, 270 cases of H5N1 infection in humans had been reported by the World Health Organization with a fatality rate of 60%. The recent outbreaks of avian influenza in humans have demonstrated the need for vaccine development. Hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), the envelope glycoproteins of the virus, are attractive vaccine candidates as they are major protective antigens and the process of production is safe. The study of the immunogenicity of the recombinant hemagglutinin and neuraminidase proteins in this study will provide useful information for further avian influenza vaccine development.

Recombinant envelope proteins H5N1, 63 kDa of rHA5 and 55 kDa of rNA1, were successfully produced in prokaryotic system by using pBAD/His expression vector. The immunogenicity of rHA5 and rNA1 recombinant proteins were assessed in BALB/C mice. The antibody titer of 1:100 and 1:5 were chosen for use in comparison of immune response in immunized mice determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), respectively. The results demonstrated that rHA5 could induce significantly higher immune response than rNA1 ($p<0.05$). The result of microneutralization assay showed that the serum from both rHA5 and rNA1 immunized mice and showed low neutralizing antibody response at titer 1:50.

This study showed that a specific antibody developed in animals immunized with rHA5 and rNA1 recombinant proteins has potential in activating neutralizing antibody and may be appropriate for further development of an avian influenza virus vaccine. The immunogenicity of rHA5 and rNA1 recombinant proteins produced in eukaryotic system and neutralizing epitope in these regions should be further studied. Moreover, the strain of the virus used in vaccine development should be accurately predicted because the neutralizing antibody has been reported to be subtype and strain specific.

KEY WORDS: H5N1 /RECOMBINANT PROTEIN/ IMMUNOGENICITY

110 pp.