HEMAGGLUTINATING ACTIVITY AND ANTIBODY RESPONSE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1)

HATAIRAT LERDSAMRAN

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

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

คุณสมบัติของฮีแมกกลูตินินและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก
(HEMAGGLUTINATING ACTIVITY AND ANTIBODY RESPONSE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1)

หทัยรัตน์ เลิศสำราญ 4736623 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุดา ลุยศิริโรจนกุล, Ph.D., พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, Ph.D.,
ประเสริฐ เอื้อวรากุล, M.D., Dr.Med., วิทวัช วิริยะรัตน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์นี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติของฮีแมกกลูตินินและดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไข้หวัดนก (H5N1) รวมทั้งเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (H1N1 และ H3N2) ด้วย

บทบาทของฮีแมกกลูตินินในการจับกับตัวรับชนิด α2,3 ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 และ α2,6 ของเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน ได้ศึกษาโดยอาศัยความสามารถของเชื้อในการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงซึ่งมาจากคนและสัตว์ทั้งหมด 5 ชนิด (คนหมู่เลือดโอ ห่าน ไก่ หนูตะเภา และม้า) ด้วยวิธี hemagglutination ร่วมกับการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเชื้อตรงส่วนฮีแมกกลูตินิน ด้วยวิธี sequencing และศึกษาแอนติบอดีต่อเชื้อนี้ในคนปกติ คนได้รับวัคซีนไข้หวัดใหญ่ ผู้ป่วยและผู้ที่มีประวัติสัมผัสเชื้อไข้หวัดนก ด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI) และ/หรือ ร่วมกับวิธี microneutralization นอกจากนี้ยังได้ทดสอบแอนติบอดีต่อ peptide ของเชื้อ H5N1 ที่ได้สังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธี ELISA

การศึกษาบทบาทของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ในการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงพบว่า เม็ดเลือดแดงทั้ง 5 ชนิด สามารถเกิดการเกาะกลุ่มกับเชื้อได้เกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ A/Clouded Leopard/Thailand (Chonburi)/AI-1216A/2004(H5N1) ไม่สามารถเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงม้าซึ่งมี α2,3 linkage เม็ดเลือดแดงห่าน (มีทั้ง α2,3 และ α2,6 linkage) ให้ความแรงของการเกาะกลุ่มกับไวรัสได้สูงที่สุด รองลงมาคือเม็ดเลือดแดงไก่ หนูตะเภา คน และม้า ตามลำดับ นอกจากนี้เม็ดเลือดแดงห่านยังสามารถใช้ในการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ H5N1 ได้ในซีรัมทุกกลุ่ม แต่ระดับของ HI แอนติบอดีที่ได้จากเม็ดเลือดแดงม้ามีความสัมพันธ์กับระดับของแอนติบอดีที่ตรวจด้วยวิธี microneutralization ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัสที่ใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบของ HI แอนติบอดีด้วย (A/Thailand/676(NYK)/05(H5N1) vs A/Thailand/KAN-1/04(H5N1), Wilcoxon's signed-rank test, $p \leq 0.05$) จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของฮีแมกกลูตินินของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 ส่วนใหญ่ไม่พบความแตกต่างในบริเวณ receptor binding site ยกเว้นสายพันธุ์ A/Thailand/676(NYK)/05 พบการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 134 ซึ่งเปลี่ยนจากกรดอะมิโนอะลานีน (A) เป็นวาลีน (V) ส่วนผลการทดสอบของแอนติบอดีต่อ peptide สังเคราะห์ของเชื้อไข้หวัดนก H5N1 พบผลไม่จำเพาะต่อการทดสอบ

เชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน (H1N1 และ H3N2) ไม่สามารถเกิดการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงม้าได้ ที่น่าสนใจพบว่าเม็ดเลือดแดงไก่ไม่เกิดการเกาะกลุ่มกับเชื้อ H3N2 ที่ใช้ในการทดสอบเกือบทุกสายพันธุ์ แต่เม็ดเลือดแดงห่านยังให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน ดังนั้นเม็ดเลือดแดงห่านมีความเหมาะสมในการใช้ตรวจหาคุณสมบัติของของฮีแมกกลูตินิน และการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ influenza A virus ทั้งเชื้อไข้หวัดนก H5N1 และเชื้อไข้หวัดใหญ่ในคน

131 หน้า

HEMAGGLUTINATING ACTIVITY AND ANTIBODY RESPONSE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1)

HATAIRAT LERDSAMRAN 4736623 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: SUDA LOUISIRIROTCHANAKUL, Ph.D.,
PILAIPAN PUTHAVATHANA, Ph.D., PRASERT AUEWARAKUL, M.D., Dr.Med,
WITTHAWAT WIRIYARAT, Ph.D.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the hemagglutinating activity and immune response of H5N1 avian influenza viruses including human influenza A viruses (H1N1 and H3N2).

The role of viral hemagglutinin for α2,3 receptor binding of H5N1 and α2,6 of human influenza A viruses was investigated by hemagglutination assay using erythrocytes from five species (human group O, goose, chicken, guinea pig, and horse). All of these viruses were also investigated in their amino acid sequence of hemagglutinin by direct sequencing. Influenza specific antibody in healthy subjects, influenza vaccinees, H5N1 cases and H5N1 exposed subjects was explored by hemagglutination inhibition (HI) assay and/or microneutralization (microNT) test. In addition, H5 peptide ELISA was established for H5N1 binding antibody screening as well.

Our data showed that all erythrocyte species could pick up almost all strains of H5N1 avian influenza viruses. Interestingly, one strain from clouded leopard (A/Clouded Leopard/Thailand(Chonburi)/AI-1216A/2004) could not agglutinate horse erythrocytes (α2,3 linkage). Goose erythrocytes (α2,3 and α2,6 linkage) gave highest hemagglutination titer followed in order of sensitivity by chicken, guinea pig, human and horse erythrocytes. In addition, goose erythrocytes seemed to be the suitable donors for HI antibody for all groups. There was a correlation of HI antibody using horse erythrocytes and microNT but HI antibody level was dependent on the virus antigen tested (A/Thailand/676(NYK)/05(H5N1) vs A/Thailand/1(KAN-1)/04(H5N1), Wilcoxon's signed-rank test, $p \leq 0.05$). It was shown that there was no difference in amino acid sequences of the receptor binding site (RBS) in all H5N1 viruses except A134V mutational change in the RBS of A/Thailand/676(NYK)/05. Unfortunately, the detection of H5 binding antibody to H5 antigenic region by peptide ELISA gave non specific results.

As expect, horse erythrocytes could not recognize human influenza A viruses (H1N1 and H3N2). Interestingly, chicken erythrocytes did not agglutinate almost all H3N2 viruses but goose erythrocytes were still sensitive. Overall, goose erythrocytes confer a greater advantage over the other erythrocyte species in the investigation of hemagglutinating activity and specific antibody to influenza A viruses including H5N1 and human influenza viruses.

KEY WORDS: AVIAN INFLUENZA H5N1 VIRUS / ERYTHROCYTE /
HEMAGGLUTINATING ACTIVITY / HEMAGGLUTINATION

131 pp.