

**DEVELOPMENT OF A DOUBLE-ANTIGEN SANDWICH ELISA
USING RECOMBINANT NUCLEOPROTEIN FOR
DETECTING ANTIBODIES TO INFLUENZA A VIRUSES**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF A DOUBLE-ANTIGEN SANDWICH ELISA USING
RECOMBINANT NUCLEOPROTEIN FOR DETECTING ANTIBODIES TO
INFLUENZA A VIRUSES

KAMOLWAN WATCHARATANYATIP 4937154 SIIM/M

M. Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: TARARAJ DHARAKUL, M.D., Ph.D.,
URAIWAN KOSITANONT, Ph.D.

ABSTRACT

Influenza A virus infection has emerged as one of the major threats to human and animal health. The current outbreak of avian influenza virus of the H5N1 type in animals has the potential to cause new influenza pandemics which may have devastating results. Serological surveillance, including serologic detection of antibodies to avian influenza virus (AIV), is of great importance in preventing and controlling avian influenza. In the present study, a double-antigen sandwich ELISA was developed for the detection of antibodies to influenza A viruses. A recombinant nucleoprotein (rNP) of influenza A virus was used as a captured antigen and also as an HRP-conjugate for detecting the antibodies. Sera from chickens, geese, open-billed storks, ducks, lesser whistling ducks, and pigeons were tested. A total of 138 serum samples (avian species) with known antibody status were tested with the ELISA. The sensitivity of ELISA was 95.6%, and the specificity 97.3% was obtained. The assay was able to detect the presence of influenza A antibodies as early as 4 days post inoculation in ducks, experimentally infected with influenza A (H5N1) virus. There was a good correlation ($r_s = 0.84$) between the double-antigen sandwich ELISA and the hemagglutination inhibition (HI) test. Excellent agreement 97.8% was obtained between the two tests ($\kappa = 0.96$). Human sera were also tested with this assay. The double-antigen sandwich ELISA results showed that this assay was able to detect additional positive samples that were negative by the HI. These results indicated that the double-antigen sandwich ELISA based on rNP may offer an effective screening method for the serodiagnosis of influenza A virus. This ELISA also enables the detection of antibodies to influenza A viruses in multi species without a need for species-specific secondary antibodies.

KEY WORDS: INFLUENZA VIRUS/ DOUBLE-ANTIGEN SANDWICH ELISA/
ANTIBODY DETECTION/ NUCLEOPROTEIN

143 pages

การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวคลีโอโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอด้วยวิธี double-antigen sandwich ELISA

DEVELOPMENT OF A DOUBLE-ANTIGEN SANDWICH ELISA USING RECOMBINANT NUCLEOPROTEIN FOR DETECTING ANTIBODIES TO INFLUENZA A VIRUSES

กมลวรรณ วัชรชัยฤทธิพิศ 4937154 SIIM/M

วท. ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ชารินทร์ ชารากุล, พ.บ., Ph.D., อุไรวรรณ โฆษิตานนท์, Ph.D.

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ เป็นหนึ่งในปัญหารุนแรงต่อคนและสัตว์ การระบาดของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ปัจจุบันในสัตว์ก่อให้เกิดการระบาดครั้งใหม่ขึ้นมา ซึ่งมีผลกระทบอย่างมาก การเฝ้าระวังโดยการตรวจทางซีรัมวิทยารวมทั้งการตรวจหาแอนติบอดีต่อไข้หวัดนกจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันและควบคุม ดังนั้นการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงพัฒนา double-antigen sandwich ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ โดยใช้ recombinant nucleoprotein ของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอ เป็น captured antigen และใช้ HRP-conjugated nucleoprotein ในการตรวจหาแอนติบอดี ในการศึกษาที่ใช้ซีรัมจากไก่, ห่าน, นกปากห่าง, เป็ด, นกเป็ดแดงและนกพิราบ จากการศึกษาซีรัมจากสัตว์ปีกที่ทราบ antibody status จำนวน 138 ตัวอย่าง ด้วยวิธี double-antigen sandwich ELISA พบว่า sensitivity และ specificity ของวิธีนี้ คือ 95.6% และ 97.3% วิธี double-antigen sandwich ELISA สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอในวันที่ 4 หลังจากเปิดทดลองถูกฉีดเชื้อไวรัส influenza A (H5N1) จากการศึกษาความสัมพันธ์และความเห็นพ้องระหว่างวิธี double-antigen sandwich ELISA และวิธี hemagglutination inhibition (HI) พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอยู่ในเกณฑ์ดี ($r_s = 0.84$) และมีความเห็นพ้องยอดเยี่ยม (97.8%; $K = 0.96$) นอกจากนี้ยังได้ทดลองตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวคลีโอโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในซีรัมคน พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมที่ให้ผลลบจากวิธี HI จากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี double-antigen sandwich ELISA เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้นที่มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ โดยสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อนิวคลีโอโปรตีนของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์เอในสัตว์หลายสปีชีส์ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ secondary antibodies ที่จำเพาะต่อสปีชีส์นั้นๆ