

一种新型 H5N1 禽流感病毒血凝素抗原快速检测试剂的建立

葛胜祥¹, 徐飞海¹, 罗海峰¹, 陈毅歆¹, 郭永利¹, 陈自敏¹, 王嘉²,
罗文新¹, 吴婷¹, 张军¹, 陈鸿霖^{2,3}, 管轶^{2,3}, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门 361005; 2. 汕头大学医学院 汕港联合流感中心, 汕头 515031;
3. 香港大学 微生物系 新发传染病国家重点实验室, 香港)

摘要: 利用 5 株广谱特异性抗 H5 亚型血凝素单克隆抗体和酶联免疫渗滤技术成功地建立了一种适于现场检测 H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白的抗原快速检测试剂 H5-HA(Ag) Dot-ELISA。该试剂对 41 株代表当前亚洲地区流行的各种遗传变异亚系 H5N1 禽流感病毒检测均为阳性, 对多数毒株的分析灵敏度优于 0.1 个血凝滴度 (HA titer), 其中部分优于 0.01 个血凝滴度; 比较该试剂与早期开发的同类 ELISA 试剂, 发现前者对后者未能检出的 H5N1 新变异株检测均为阳性; 利用该试剂和商品化 Directigen Flu A (BD) 试剂检测两株 H5N1 病毒株, 提示前者灵敏度高于后者; 该试剂对一株 H5N1 病毒的检测灵敏度与标准 RT-PCR 相当; 该试剂对 24 株非 H5 亚型病毒检测均为阴性, 显示出良好特异性。以上结果提示, 此研究建立的 H5N1 病毒抗原快速检测试剂在 H5 禽流感现场检测上具有较好的应用前景。

关键词: 禽流感病毒; H5N1; 抗原快速检测; 血凝素; 单克隆抗体

中图分类号: R373.2⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2006)06-0445-05

1997 年香港报道了全球首个人感染高致病性 H5N1 禽流感事件, 改变了禽流感病毒不能直接传人的传统观念^[1-3]。2003 年底至今, 东南亚国家持续暴发 H5N1 禽流感疫情并随着候鸟迁移不断向亚洲、欧洲和非洲国家扩散传播^[4], 各国养禽业因此遭受灭顶之灾, 同时不断引发的人感染死亡事件也给各国公共卫生工作带来严峻挑战, 截止 2006 年 5 月 19 日, WHO 正式统计的全球 H5N1 感染病例已达 217 人, 死亡 123 人^[5]。高致病性 H5N1 禽流感病毒成为最有可能导致下一次人类全球大流感的病毒株^[6], 因此及时监控 H5N1 疫情, 对禽流感疑似病禽或病人进行 H5N1 病毒感染的现场快速筛查对于疫情的快速控制具有重要意义。

H5N1 病毒诊断方法包括病毒培养、PCR 检测、免疫荧光检测和血清学检测等^[7]。病毒培养方法

费时较长, 一般需要 3~7d, 且需配备三级生物安全实验室和专业人员。直接免疫荧光法 (DFA)^[7], 检测约需 2h~1d, 对标本质量要求较高, 需专业人员操作和昂贵的荧光显微镜, 且存在灵敏度不足等缺点。PCR 方法^[8-10]能在数小时内得出检测结果, 灵敏度也较高, 但其主要缺点是需专业操作人员和配备昂贵的仪器及试剂, 且由于易产生假阳性, 需要多次重复检测来确证, 这使其应用范围仅局限于大型医疗诊断中心。新型 DNA 芯片检测方法^[11], 可以同时检测多种病原体, 但缺点是技术尚未成熟, 同样依赖于专业技术人员和昂贵的仪器而使其用途有限。血清学检测方法虽具高灵敏性和特异性, 但仅仅只是一种回顾性检测手段。因此这些方法仅适用于专业实验室检测, 无法满足 H5N1 疫情快速诊断需要。而其它商业化流感病毒抗原快速检测试剂如 Directigen Flu A (Becton Dickinson, USA) 或 Binax NOW (Binax Inc., USA) 等^[12-13], 虽然都具备了方便、快速、适于现场检测等优点, 但其缺点是只能测定流感病毒的型别 (即 A、B、C 型), 而不能直接测定病毒的 HA (血凝素) 亚型。由于 16 种 HA 亚型 A 型流感病毒在禽鸟中均广泛存在^[14], 仅确定病毒的型别不足以满足高致病性 H5N1 禽流感疫情的早期控制需要, 因此世界各国迫切需要一种能够直接鉴定禽流感病毒亚型且能满足现场检测需要的检测试

收稿日期: 2006-07-26; 修回日期: 2006-09-14

基金项目: 国家禽流感防治专项 (2004BA519A73); 福建省科技重点项目 (2005Y020); 福建省科技重大专项 (2004YZ01-1); 教育部跨世纪优秀人才培养计划。

作者简介: 葛胜祥 (1974-), 男, 湖北人, 博士研究生, 研究分子病毒学和免疫学。

通讯作者: 夏宁邵 (1964-), 男, 湖南娄底人, 博士生导师, 研究方向: 分子病毒学。Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2181258 (E-mail: nsx@xmu.edu.cn)

剂。

本研究利用自行开发的抗 H5 单抗和酶联免疫渗滤技术建立了一种适于现场检测需要的 H5 亚型禽流感病毒 HA 抗原快速检测试剂。

材料与方 法

1 细胞、动物和试剂 小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/0-Ag14 (Sp2/0) 为本实验室保存。BALB/c 小鼠(6~8 周龄)为本中心动物室提供。PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基喋呤、DMSO 和 HRP 等为 Sigma 公司的产品。RPMI 1640 基础培养基为 Gibco 公司的产品。胎牛血清为 Hyclone 公司的产品。HRP-GAM-IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 及 GAM-IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 为 Serotec 公司的产品。A 型流感病毒抗原快速检测试剂(Directigen Flu A kit), 购自美国 BD 公司。H5 抗原酶免检测试剂—H5-HA(Ag) ELISA(H5-ELISA), 为北京万泰生物药业有限公司产品^[15]。H5N1 病毒 RT-PCR 标准检测方法参见文献^[16]。

2 病毒及其分离、培养和鉴定 所有病毒均来自灭活后的鸡胚培养尿囊液, 由香港大学提供。病毒标本来源背景参见文献^[16], 分别来自华南地区活禽市场中饲养的无症状禽、华南地区越冬候鸟、东南亚 H5N1 禽流感疫区的病禽或死禽。所有病毒标本经鸡胚培养法定性后再用标准抗血清鉴定分型, 病毒含量测定采用标准血凝试验方法^[17]。

3 抗 H5 单抗的制备与鉴定 本实验室曾报道了 2F2 和 3C8 等多株抗 H5 亚型血凝素单抗的制备^[15, 18]。以类似方法又筛选获得 3G4、4D1 和 10F7 等多株广谱性抗 H5 亚型血凝素单抗, 经小鼠腹腔制备获得腹水后, 用硫酸沉淀和 DE-52 阴离子交换层析柱纯化。利用不同遗传亚系的 H5N1 病毒变异代表株和非 H5 亚型病毒株测定单抗的血凝抑制(HI)活性, 并依此筛选出上述五株广谱特异性抗 H5 亚型血凝素单抗用于快速抗原检测试剂的制备。

4 H5-HA(Ag) Dot-ELISA(H5-Dot) 首先将高纯度抗 H5 亚型血凝素单抗 3G4 溶解于 10 mmol/L 的磷酸缓冲液(PB, pH7.4)中, 按每次 2 μg 包被于渗滤检测装置的硝酸纤维素膜上的样品检测区, 同时包被 200 ng 羊抗鼠 IgG 于对照区, 干燥后真空密封保藏于室温阴凉处。检测步骤为: ①标本预处理: 取 200 μl 待测标本(病毒培养液或拭子标本浸出液)加入样品处理装置中, 再滴入 14 滴裂解液并充分混匀; ②加样: 将上述处理样品全部滴入样品检测区, 待样品完全渗滤干净; ③加入酶标二抗: 在检测区继续滴入 4 滴标记 HRP 的抗 H5 亚型血凝素单抗(2F2、3C8、4D1、10F7), 标记方法见^[15], 待酶标试剂完全渗滤干净后静置 2 min; ④洗涤: 用专用洗涤液洗涤 3 遍; ⑤显色读值: 待所有液体渗滤干净后, 滴入 2 滴专用显色液显色 3 min 后判定结果(如图 1 所示)。整个检测周期约 40 min。

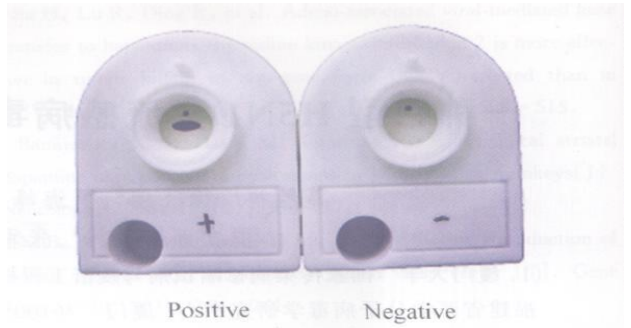


图 1 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 阴性及阳性结果示意图
Figure 1 Schematic diagram of detection result shown with H5-HA(Ag) Dot-ELISA

结 果

1 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 对各种 H5N1 代表病毒培养液的检测

根据系统进化树选择代表 2002~2006 年间亚洲地区流行的不同遗传分支^[16]的 41 株 H5N1 病毒鸡胚培养尿囊液稀释至病毒含量为 1 个血凝滴度, 用 H5-Dot 进行检测, 并与 H5-ELISA 进行比较, 其中 23 株最具代表性病毒株的检测结果如表 1 所示。可见 H5-Dot 对 23 株病毒均为阳性, 而 H5-ELISA 对其中 6 株病毒反应阴性, 说明 H5-Dot 试剂具有良好的广谱性, 能够检测出当前亚洲地区流行的各种变异亚系 H5N1 病毒, 包括最近出现的两个变异较大的病毒亚系—VNM2 亚系和 HK06 亚系在内。

2 H5-Dot 的分析灵敏度

将上述 41 株 H5N1 病毒标本进行 10 倍系列稀释, 用于检测 H5-Dot 试剂的分析灵敏度(表 2), 结果表明该试剂对不同毒株的检测下限均能达到 1 个血凝滴度, 多数可达 0.1 个血凝滴度(28/41), 其中 10 株可达 0.01 个血凝滴度。

选取两株 H5N1 病毒鸡胚培养尿囊液, 进行系列稀释, 分别以 H5-Dot 和 BD 公司的 Directigen Flu A 试剂检测。结果 H5-Dot 对 Ck/HK/YU22/02 分析灵敏度高于 0.02 个血凝滴度, 而 Directigen Flu A 试剂仅为 0.625 个血凝滴度; H5-Dot 对另一株病毒(Ck/YN/115/04)的分析灵敏度约为 0.156 个血凝滴度, 而 Directigen Flu A 试剂约为 1.25 个血凝滴度(表 3)。提示 H5-Dot 试剂有更高的分析灵敏度。

比较 H5-Dot 和标准 RT-PCR 法对 H5N1 病毒的检测灵敏度(表 4), 可见两种方法对 H5N1 病毒 Ck/HK/Yu22/02 (HA titer=1 024)的分析灵敏度

相当, 对 1: 10 000 稀释的同一份标本的检测均显示 阳性。

表 1 H5-HA(Ag) ELISA 和 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 对不同遗传亚系 H5N1 病毒尿囊液的检测

Table 1 Detection of isolates representing different sub-lineages of H5N1 virus in the allantoic fluid with H5-HA(Ag) Dot-ELISA and H5-HA(Ag) ELISA

Virus	Sublineage	HA titer	Results	
			H5-ELISA	H5-Dot
Ck/HK/YU 22/02	Reference	1*	++	+++
Dk/HN/101/04	HN	1	+++	+++
Ck/HN/999/05	HN	1	+	+++
Ck/YN/115/04	YN	1	++	+
Ck/YN/447/05	YN	1	++++	+++
Ck/Jogjarkarta/BBVe-1X/04	IDN	1	+	+
Dk/IDN/MS/04	IDN	1	++	+++
Indonesia/5/05	IDN	1	-	+
Ck/Malaysia/5858/04	VTM	1	++	+++
VNM/1194/04	VTM	1	+	++
Dk/VNM/S654/05	VTM	1	++++	+++
Dk/Vietnam/568/05	VNM2	1	-	++
Dk/HK/821/02	GD	1	++++	++++
HK/213/03	GD	1	++	+++
Peregrine/HK/D0028/04	GD	1	++++	++++
CP-Heron/HK/18/05	Mixed	1	++	+++
Dk/FJ/897/05	Mixed	1	++++	+++
Dk/GX/380/04	Mixed	1	-	+++
MDk/JX/1653/05	MB	1	++	++
BH Gs/QH/65/05	MB	1	++++	+++
Oriental Magpie Robin/HK/366/06	HK06	1	-	+++
Japanese White Eyas/HK/1038/06	HK06	1	-	+
Common Magpie/HK/2256/06	HK06	1	-	++

*. Titer of virus determined by hemagglutinin test; +. Positive; -. Negative. Sublineage Defined by Chen et al.^[16]; HK. Hong Kong; YN. Yunnan; GX. Guangxi; FJ. Fujian; HN. Hunan; JX. Jiangxi; QH. Qinghai; IDN. Indonesia; GD. Guangdong; MB. Migratory bird; VTM. Vietnam/Thailand/Malaysia; VNM2. Recent Vietnam introduction; HK06. New isolates from Hong Kong in 2006; Ck. Chicken; Dk. Duck; Gs. Goose; Qa. Quail; MDk. Migratory duck; CP Heron. Chinese pond heron; BH Gs. Bar-headed goose.

表 2 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 对不同遗传亚系 H5N1 病毒尿囊液的分析灵敏度

Table 2 Analytical sensitivity of detection of different sublineages of H5N1 representative virus strains in allantoic fluid with Wantai H5-HA(Ag) Dot-ELISA reagent

HA Titer	No. of H5N1 tested	Positive rate(%)
1	41	41/41(100%)
0.1	41	28/41(68%)
0.01	41	10/41(24%)

3 H5-Dot 对各种非 H5 亚型 A 型流感病毒及 NDV 的特异性

对 22 株含量为 10 个血凝滴度的非 H5 亚型 A 型流感病毒和 2 株鸡新城疫病毒(NDV)的鸡胚培养尿囊液进行 H5-Dot 检测, 结果 24 株非 H5 病毒均为阴性(表 5)。

表 3 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 与 Directigen Flu A(BD) 检测 H5N1 病毒的分析灵敏度比较

Table 3 Comparison of analytical sensitivity between H5-HA(Ag) Dot-ELISA and Directigen Flu A(BD) kit in detecting H5N1 virus

HA Titer	Ck/HK/YU 22/02		Ck/YN/115/04	
	H5-Dot	Directigen Flu A	H5-Dot	Directigen Flu A
10		++		++
1.25	+++	+	+	+
0.625	++	+/-	+	-
0.3125	++		+	
0.156	ND		+/-	
0.02	+			

+ . Positive; +/- . Weak positive; - . Negative; ND. Not determined.

表 4 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 与 RT-PCR 法检测 H5N1 病毒的灵敏度比较

Table 4 Comparison of analytical sensitivity between H5-HA(Ag) Dot-ELISA and standard RT-PCR in detecting H5N1 virus

	Dilution ratio of Ck/ HK/ Yu22/ 02				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
H5-Dot	+	+	+	+	-
RT-PCR	+	+	+	+	-

+ . Positive; - . Negative.

表 5 H5-HA(Ag) Dot-ELISA 检测非 H5 亚型病毒尿囊液的特异性

Table 5 Specificity of H5-HA(Ag) Dot-ELISA shown with non-H5 viruses in allantoic fluid

Subtype	Virus name	Host type	HA Titer	Results
H1N1	Dk/ ST/ 1734/ 03	Avian	10	-
H1N1	PR/ 8/ 34	Human	10	-
H1N1	Taiwan/ 1/ 86	Human	10	-
H1N1	Beijing/ 262/ 95	Human	10	-
H1N1	Sw/ HK/ 168/ 93	Swine	10	-
H2N8	Dk/ ST/ 992/ 00	Avian	10	-
H3N3	Dk/ ST/ 708/ 00	Avian	10	-
H3N2	Texas/ 1/ 77	Human	10	-
H3N2	Beijing/ 32/ 92	Human	10	-
H3N2	Sw/ HK/ 74/ 02	Swine	10	-
H3N8	Eq/ Jinlin/ 89	Equine	10	-
H4N6	Dk/ SIBERIA/ 378/ 01	Avian	10	-
H6N1	Teal/ HK/ W312/ 97	Avian	10	-
H7	Dk/ C/ A47	Avian	10	-
H8N4	Turkey/ Ontario/ 6118/ 68	Avian	10	-
H9N2	Qa/ HK/ G1/ 97	Avian	10	-
H9N2	Dk/ HK/ G9/ 97	Avian	10	-
H9N2	Dk/ HK/ Y280/ 97	Avian	10	-
H10N4	Dk/ ST/ 1796/ 01	Avian	10	-
H11N1	Dk/ ST/ 834/ 01	Avian	10	-
H12N5	Dk/ HK/ 838/ 80	Avian	10	-
H13N5	Gull/ MD/ 704/ 77	Avian	10	-
NDV	Ck/ ST/ 4268/ 02	Avian	10	-
NDV	Sck/ ST/ 1670/ 03	Avian	10	-

- . Negative; Dk. Duck; Sw. Swine; Eq. Equine; Qa. Quail; Ck. Chicken; Sck. Silk chicken; NDV. Newcastle disease virus.

讨 论

H5N1 病毒具有高度变异性, 其基因组八条片段中尤以 HA 基因变异最大, Chen H, et al.^[16] 利用分子进化分析和抗原性分析手段证实当前亚洲地区流行的 H5N1 病毒已演变成八个不同的遗传亚系, 各亚系病毒间的 HA 蛋白存在不同程度的抗原性差别。本研究基于五株广谱性抗 H5 亚型血凝素单抗和酶联免疫渗滤技术建立了能够直接检测 H5N1 病

毒 HA 蛋白的抗原快速检测试剂 H5-Dot, 该试剂对包括最新两个高变异亚系在内的当前亚洲地区流行的各种遗传亚系 H5N1 病毒变异株均能检出, 而对非 H5 病毒株无交叉反应, 说明该试剂能够用于当前流行的 H5N1 禽流感病毒的 H5 亚型特异性诊断。该试剂的应用无需任何专用仪器, 操作简便, 无需特殊培训, 检测周期不超过 40 分钟, 可满足野外现场检测需要。

2005 年本实验室陈毅歆等^[15] 已报道利用自主开发的一株抗 H5 亚型血凝素单抗 2F2 成功建立了两种检测 H5N1 病毒 HA 蛋白的 H5 亚型禽流感病毒抗原检测试剂, 分别是基于双抗体酶联免疫技术的 H5-HA(Ag) ELISA 和基于胶体金免疫技术的 H5 抗原胶体金免疫试剂^[15]。经过长期临床实验分析, 发现前者对目前出现的绝大部分 H5N1 病毒分离株仍有较高的灵敏度但不适于现场检测; 后者虽然具有快速简便、无需专用仪器等适于现场检测的优点, 但灵敏度较低。因此随着 H5N1 疫情的日趋严重, 迫切需要对现有检测试剂进行更新换代, 开发一种兼备上述两种试剂优点的抗原快速检测试剂, 使高灵敏性与方便的操作性较好结合。而经上述初步实验室评估证实基于酶联免疫渗滤技术的 H5-Dot 是一种有较大潜力的 H5 亚型禽流感病毒抗原快速检测试剂, 目前我们已与有关单位合作进行该试剂对各种现场标本的检测评估, 初步结果提示前景较为乐观。

研究还发现 H5-Dot 试剂对不同病毒株的灵敏度有所不同, 早期开发的 H5-ELISA^[15] 由于仅使用一株单抗 2F2 而对部分新出现的 H5N1 病毒变异株已丧失反应性, 随着后期四株新单抗的补充与应用, 使得六株 H5-ELISA 未能检出的 H5N1 新变异株均可被后续开发的 H5-Dot 检出(表 1), 提示加强对病毒抗原变异的监控, 及时发现单抗反应谱的变化并据此及时更新试剂盒所使用单抗是十分必要的。

参考文献:

- [1] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279: 393- 396.
- [2] Claas E C, Osterhaus A D, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus[J]. Lancet, 1998, 351: 472- 477.
- [3] Guan Y, Poon L L, Cheung C Y, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 8156- 8161.

- [4] World Organisation for Animal Health(OIE). Update on avian influenza in animals (type H5). Most recent official reports[DB]. 2006 May 18[Cited 2006 May 22]. Available from http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm.
- [5] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO[DB]. 2006 May 19[Cited 2006 May 22]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_05_19/en/index.html.
- [6] Fauci A S. Pandemic influenza threat and preparedness[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 73– 77.
- [7] Beigel J H, Farrar J, Han A M, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1374– 1385.
- [8] Yuen K Y, Chan P K, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus[J]. *Lancet*, 1998, 351: 467– 471.
- [9] Ng E K, Cheng P K, Ng A Y, et al. Influenza A H5N1 detection[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 1303– 1305.
- [10] Ellis J S, Zambon M C. Molecular diagnosis of influenza[J]. *Rev Med Virol*, 2002, 12: 375– 389.
- [11] Wang Z. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 638– 646.
- [12] Weinberg A, Walker M L. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12: 367– 370.
- [13] Landry M L, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B[J]. *J Clin Virol*, 2004, 31: 113– 115.
- [14] Webster R G, Peiris M, Chen H, et al. H5N1 outbreaks and enzootic influenza[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 3– 8.
- [15] 陈毅歆, 罗海峰, 葛胜祥, 等. 高致病性 H5 亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体的制备与初步应用[J]. *病毒学报*, 2005, 21: 422– 427.
- [16] Chen H, Smith G J, Li K S, et al. Establishment of multiple sub-lineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2845– 2850.
- [17] WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance[DB]. 2004 Sep 1[Cited 2006 May 22]. Available from http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html.
- [18] Li K S, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. *Nature*, 2004, 430: 209– 213.

Establishment of a New Rapid Antigen Detection Test for HA of H5N1 Avian Influenza Virus

GE Sheng-xiang¹, XU Fei-hai¹, LUO Hai-feng¹, CHEN Yi-xin¹, GUO Yong-li¹, CHEN Zi-min¹, WANG Jia², LUO Wen-xin¹, WU Ting¹, ZHANG Jun¹, CHEN Hong-lin^{2,3}, GUAN Yi^{2,3}, XIA Ning-shao¹

(1. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development of Infectious Diseases, The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Research Center of Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Joint Influenza Research Center (SUMC & HKU), Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China;

3. State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China)

Abstract: We used five H5 specific broad spectrum mAbs to develop a rapid antigen detection test “H5-HA(Ag) Dot-ELISA” which combines immune-filtration with double antibody “sandwich”-like principle for detection of hemagglutinin antigen (Ag) of H5 avian influenza virus. It was shown that the analytical sensitivity of H5-HA(Ag) Dot-ELISA in detecting 41 strains of human or avian H5N1 cultured viruses was at least 1 HA titer, some even up to 0.01 HA titer, and 0.1 HA titer for most strains. Comparison of this kit with our earlier developed H5-ELISA, it showed that the former had a higher detection rate than the latter in detecting these 41 H5N1 viruses. It also displayed higher sensitivity than BD commercialized Directigen Flu A kit when detecting two H5N1 viruses. It also had an equivalent sensitivity for H5N1 strain “Ck/HK/ Yu22/02” when compared with standard RT-PCR. This kit also had a nice specificity and showed no cross-reactivity with 24 strains of non H5 virus. These results suggested that H5-HA(Ag) Dot-ELISA will be very useful in diagnosing H5N1 virus in the field.

Key words: avian influenza virus; H5N1; rapid antigen detection; HA; mAb