โรคไข้หวัดนกเป็นโรคสัตว์ติดคนที่มีความสำคัญด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจ และสังคม การตรวจวินิจฉัยโรคที่แม่นยำสามารถจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก จำเป็นต้องมีแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีคุณภาพ โมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นแอนติบอดีที่มีคุณภาพและมีความจำเพาะสูง การพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูปด้วยเทคนิค Monoclonal-based competitive ELISA สามารถตรวจสอบแอนติบอดีต่อโรคไข้หวัดนกและการจำแนกแอนติบอดีจำเพาะต่อสับไทป์ H5 จากสัตว์ชนิดต่างๆ ได้

การผลิตวัตถุดิบสำหรับการเตรียมเชื้อไวรัสที่เข้มข้นและบริสุทธิ์ อาศัยผลการทดลองเพื่อเลือกโฮสต์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส พบว่าไข่ฟักมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสได้ดี ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเชื้อไวรัสคือ 24 ชั่วโมงภายหลังการฉีดเชื้อไวรัส การเตรียมเชื้อไวรัสที่เข้มข้นและบริสุทธิ์จากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ใช้เทคนิค sucrose continuous gradient ได้แถบของโปรตีนจากเชื้อไวรัส 2 แถบ แถบแรกมีความเข้มข้นโปรตีน 30.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี haemagglutination (HA) titer 40,960 ส่วนอีกแถบที่สอง มีความเข้มข้น 24.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมี HA titer 10,240 ตรวจสอบยืนยันคุณลักษณะของเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยอาศัยไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ H5 gene โดยเทคนิค two-step RT-PCR การวิเคราะห์คุณสมบัติของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค Western blot assay พบแถบโปรตีน haemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP) และ matrix (M) จากเชื้อไวรัสดังกล่าว และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองได้ดี

สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ภายหลังผ่านขั้นตอนการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา และกระบวนการ limiting dilution สามารถคัดเลือกโคลนที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้สูง จำนวน 6 โคลน จาก master 8B4 ร่วมกับการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีน NP และ HA สำหรับการใช้ในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูป competitive ELISA ที่รอการทดสอบให้ได้มาตรฐานทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนาม นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ยังได้พัฒนาชุดทดสอบ indirect ELISA สำหรับการทดสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในไก่อีกด้วย

Avian influenza virus (AIV) H5N1 has a significant impact to the public health concern as well as economic and social aspects. Accurated diagnostic tests require good quality antigens and antibodies. Monoclonal antibodies provide good specificity and are commonly used as diagnostic reagents in monoclonal-based competitive ELISA. This assay has a potential of being a universal test for serological diagnosis of avian influenza in all animal species including human beings.

The production of purified and concentrated AIV depended on the selection of the appropriated system between Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell lines and chicken embryonic eggs. The results indicated that H5N1 virus propagated better in the chicken embryonic eggs considering as the system of choice for the H5N1 virus isolation and propagation. The optimal time for harvesting the selected Thai isolate was at 24 hours after inoculation. When concentrated and purified by sucrose continuous gradient technique, two viral bands were presented. The first viral band had 30.40 mg/ml protein content or equivalent with 40,960 HAU. The second viral band had 24.11 mg/ml protein content (10,240 HAU). The concentrated and/or purified virus was performed for the H5 viral nucleic acid detection using two-step RT-PCR and SDS-PAGE and Western blot assay revealing haemagglutinin (HA), nucleoprotein (NP) and matrix (M) proteins. This purified virus was able to stimulate antibody response in mice.

For the monoclonal antibody production, screening and cloning of hybridoma cells by the limiting dilution procedures yielded six clones from the master 8B4. Togetehr with the monoclonal antibodies, recombinant NP and HA proteins, a competitive ELISA was prepared and is yet to be validated both in the laboratory and in the field. In addition, indirect ELISA was developed to detect antibodies against avian influenza H5N1 virus in chickens.