

## Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Nucleoprotein as Antigen for Detection of Antibodies to Avian Influenza Virus

Meilin Jin,<sup>AB</sup> Guihua Wang,<sup>A</sup> Ruihua Zhang, Siting Zhao, Hongchao Li, Yadi Tan, and Huanchun Chen

Lab of Animal Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Received 22 June 2004; Accepted 1 August 2004

**SUMMARY.** During the avian influenza outbreak of 2003–04 in Southeast Asia, two avian influenza viruses (AIV), one of H5N1 subtype and the other H9N2 subtype, were isolated and identified from local farms. The nucleoprotein (NP) gene of the H5N1 AI isolate was cloned, and the segment encoding amino acid 47–384, which covers its major antigenic domains, was subcloned and expressed in *E. coli*. Subsequently, the NP (47–384) expression product was purified and used as the diagnostic antigen to develop a NP-based type-specific indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antibodies to AI from chicken sera. The ELISA is shown to be specific for AIV and does not cross-react with chicken sera that has antibodies to other avian viruses. The NP<sub>(47–384)</sub>-ELISA was compared with a hemagglutination inhibition test and a commercial AIV ELISA kit in evaluating 150 sera samples from experimentally AIV-infected or vaccinated specific-pathogen-free (SPF) chickens. Our NP<sub>(47–384)</sub>-ELISA was more sensitive than the two tests and showed an 82% agreement ratio with the HI test and an 80.67% agreement ratio with the commercial kit. The NP<sub>(47–384)</sub>-ELISA and the commercial AIV ELISA were used to evaluate 448 field sera samples from diseased chickens or vaccinated chickens during the 2003–04 AI outbreak in China. The two ELISA tests had a 95% agreement ratio. We conclude that the NP<sub>(47–384)</sub>-ELISA developed in our laboratory was specific and sensitive and it has great application potential in China's long-term prevention and control of AI.

**RESUMEN.** Desarrollo de una prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas empleando la nucleoproteína como antígeno para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza aviar.

Durante el brote de influenza aviar ocurrido entre los años 2003–04 en el Sureste de Asia, se aislaron e identificaron dos virus de influenza aviar, subtipos H5N1 y H9N2, los cuales fueron aislados de granjas locales. Se aisló y clonó el gen de la nucleoproteína del aislamiento H5N1 y se subclonó y expresó en *E. coli* el segmento que codifica los aminoácidos 47 al 384, el cual abarca los dominios antigénicos principales. Se purificó el producto de la nucleoproteína expresado y se empleó para detectar antígeno con el fin de desarrollar una prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas (ELISA) específica de la nucleoproteína para detectar anticuerpos contra el virus de influenza aviar en sueros de aves. Se demostró la especificidad de la prueba ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de influenza aviar mediante la ausencia de reacciones cruzadas con sueros de aves con anticuerpos contra otros virus aviarios. Se comparó la prueba ELISA específica de la nucleoproteína (aminoácidos 47 al 384) con la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y con un kit comercial ELISA para el virus de influenza aviar mediante la evaluación de 150 sueros de aves libres de patógenos específicos infectadas experimentalmente o vacunadas con el virus de influenza aviar. Se observó una mayor sensibilidad en la prueba ELISA específica de la nucleoproteína (aminoácidos 47 al 384) al ser comparada con las otras dos pruebas, mostrando una concordancia del 82% con la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación y del 80.67% con el kit comercial ELISA. Se empleó la prueba ELISA específica de la nucleoproteína (aminoácidos 47 al 384) y el kit comercial ELISA del virus de

<sup>A</sup>These two authors contributed equally to this work.

<sup>B</sup>Corresponding author. 1 Shizishan Street, Wuhan, Hubei 430070, P.R. China.