



# 口蹄疫病毒 O 型中和抗体检测固相阻断 ELISA 方法的建立

邢向川<sup>1,2</sup>, 李坤<sup>1</sup>, 付元芳<sup>1</sup>, 包慧芳<sup>1</sup>, 李冬<sup>1</sup>, 卢曾军<sup>1\*</sup>, 刘在新<sup>1</sup>, 曹轶梅<sup>1\*</sup>

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州 730046
- 2 天津威特生物医药有限公司, 天津 300301

邢向川, 李坤, 付元芳, 包慧芳, 李冬, 卢曾军, 刘在新, 曹轶梅. 口蹄疫病毒 O 型中和抗体检测固相阻断 ELISA 方法的建立. *微生物学报*, 2022, 62(11): 4517–4528.

Xing Xiangchuan, Li Kun, Fu Yuanfang, Bao Huifang, Li Dong, Lu Zengjun, Liu Zaixin, Cao Yimei. Development of a solid-phase blocking ELISA for the detection of neutralizing antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4517–4528.

**摘要:**【目的】为评价 O 型口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)灭活疫苗免疫后中和抗体(neutralizing antibodies, NA)水平, 建立检测中和抗体的固相阻断 ELISA (neutralizing antibodies solid-phase blocking ELISA, NA-SPBE)方法。【方法】本研究以本实验室前期制备的 FMDV 广谱反应性牛源单克隆抗体 E32 作为捕获抗体, 以生物素标记的 FMDV O 型型内广谱中和牛源单克隆抗体 C4 作为检测抗体, 经过条件优化建立了检测 FMDV O 型中和抗体的固相阻断 ELISA 方法, 并对该方法进行了敏感性、特异性、重复性、交叉反应性与病毒中和试验(virus neutralization test, VNT)相关性等试验。【结果】抗体 E32 最佳包被浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , O 型 FMDV 灭活抗原最佳稀释浓度为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 生物素标记抗体 C4-Bio 最佳工作浓度为 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 链霉亲和素-HRP 的最佳稀释度为 1:40 000。以 1.35  $\log_{10}$  作为效价判定临界值时, 敏感性和特异性分别为 97.14%和 98.84%。利用该方法分别检测 FMDV A 型、FMDV Asia1 型、BVDV、PRRSV、CSFV、PPRV 抗体阳性血清时, 均为阴性, 未出现交叉反应。该方法批内和批间重复试验的变异系数均 $<10\%$ , 表明其重复性较好。利用该方法与 VNT 分别对 160 份血清样品进行检测, 二者的

**基金项目:** 国家重点研发计划(2021YFD1800300)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300)

\*Corresponding authors. CAO Yimei, Tel: +86-931-8343390, E-mail: caoyimei@caas.cn; LU Zengjun, Tel: +86-931-8343390, E-mail: luzengjun@caas.cn

Received: 19 March 2022; Revised: 18 May 2022; Published online: 17 June 2022

相关系数  $r$  为 0.807 5,  $P < 0.000 1$ , 相关性显著。【结论】该方法可以检测 FMDV O 型中和抗体, 为 FMDV O 型灭活疫苗免疫效果评价提供有力技术支撑。

关键词: 口蹄疫病毒; 牛源单克隆抗体; 中和抗体; 固相阻断 ELISA

## Development of a solid-phase blocking ELISA for the detection of neutralizing antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O

XING Xiangchuan<sup>1,2</sup>, LI Kun<sup>1</sup>, FU Yuanfang<sup>1</sup>, BAO Huifang<sup>1</sup>, LI Dong<sup>1</sup>, LU Zengjun<sup>1\*</sup>, LIU Zaixin<sup>1</sup>, CAO Yimei<sup>1\*</sup>

1 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, OIE/National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory of China, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

2 Tianjin Weite Biological Medicine Co., Ltd., Tianjin 300301, China

**Abstract:** [Objective] To evaluate the level of neutralizing antibodies (NA) against foot-and-mouth disease virus (FMDV), a solid-phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on bovine monoclonal antibodies was developed. [Methods] In this study, the bovine monoclonal antibody (mAb) E32 was used as the capture antibody and a biotinylated bovine mAb C4 as the detection antibody. Both mAbs had been produced in our laboratory. The mAb E32 is a cross-reactive antibody against FMDV and the mAb C4 is an intraserotype broadly neutralizing antibody against FMDV serotype O. With the two mAbs, a solid-phase blocking ELISA for detecting neutralizing antibody (NA-SPBE) against FMDV serotype O was developed. The sensitivity, specificity, repeatability, cross-reactivity, and correlation with virus neutralization test (VNT) of this assay were assessed. [Results] The optimum working concentrations of antibody E32, FMDV-inactivated antigen, and biotinylated C4 were 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 0.25  $\mu\text{g/mL}$  and 0.06  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and the optimum dilution of streptavidin-HRP was 1:40 000. When 1.35  $\log_{10}$  was used as the cut-off value, the sensitivity and specificity of the assay were determined as 97.14% and 98.84%, respectively. There was no cross reactivity with the antibodies specific to bovine viral diarrhea virus (BVDV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV), peste des petits ruminant virus (PPRV), or FMDV serotypes A and Asia1. The intra-batch and inter-batch repeatability of the assay showed the coefficient of variation less than 10%. The detection of 160 serum samples demonstrated a correlation ( $r=0.807 5$ ,  $P < 0.000 1$ ) between the titers obtained by NA-SPBE and VNT. [Conclusion] NA-SPBE can detect the neutralizing antibodies against FMDV serotype O and provides powerful technical support for evaluating the efficacy of FMDV serotype O-inactivated vaccine.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus; bovine monoclonal antibody; neutralizing antibodies; solid-phase blocking ELISA

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒引起的一种高度传染性的疾病, 主要感染偶蹄动物, 如牛、猪、绵羊、山羊等。该病能够导致动物生产力严重下降和新生动物高死亡率, 经济损失巨大<sup>[1-2]</sup>。消灭和控制口蹄疫是各国政府共同关注的世界性问题<sup>[3-4]</sup>。

目前, 多数国家通过检测针对 FMDV 结构蛋白的抗体水平评价 FMD 疫苗的免疫效力、指导免疫接种计划、流行病学调查和地区疫情监测, 并依此实行 FMD 免疫清除计划<sup>[5]</sup>。然而在临床中, 常发生注射 FMDV 疫苗, ELISA 试剂盒也能检出较高阳性率, 但接种动物的保护力却与预期效果不符的现象<sup>[6]</sup>。因此, 能够准确地检测出动物体内具有中和能力的抗体水平就显得尤为重要。

国际动物卫生组织(Office International des Epizooties, OIE)推荐体外评估 FMD 疫苗免疫效果的方法包括病毒中和试验(VNT)、固相竞争 ELISA (SPCE)和液相阻断 ELISA (LPBE)<sup>[1]</sup>。VNT 是以病毒与血清中和后的感染力为依据, 从而判断血清中抗体消长情况及对病毒的中和能力<sup>[7]</sup>, 具有敏感性高、特异性好等特点, 是检测 FMDV 中和抗体的金标准方法<sup>[8]</sup>。但该方法对实验条件要求较高, 需操作活毒, 须在高级别生物安全实验室中进行, 且细胞状态对实验结果影响较大, 不同批次实验结果存在一定差异性。LPBE 具有敏感性高、重复性好、操作便捷等优点。但基于豚鼠和兔子多抗血清的传统 LPBE 在不同动物群体会产生不同比例的假阳性<sup>[9-10]</sup>。SPCE 在特异性和高通量检测的能力方面优于 LPBE, 但使用的多抗血清与 LPBE 相同<sup>[11-12]</sup>。

与多克隆抗血清相比, 使用单克隆抗体可提升 ELISA 特异性、准确性、批间稳定性, 且易于标准化。单克隆抗体传统上是从小鼠杂交

瘤细胞中制备的。然而, 使用小鼠单克隆抗体作为检测试剂并不是最理想的, 因为小鼠对 FMDV 的抗体反应可能在表位结构和偏好上与自然宿主(如牛、羊和猪)不同<sup>[13]</sup>。此外, 由于杂交瘤的不稳定性, 长期使用单克隆抗体可能会丢失<sup>[14-17]</sup>。近年来, 荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)和单细胞分离技术的结合, 可从外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中分离出单个分泌 IgG 的 B 细胞, 并通过单细胞 DNA 测序获得编码成对轻链和重链可变区的 cDNA 序列<sup>[18-21]</sup>, 随后在哺乳动物细胞系统(如 CHO-S 或 HEK 293T)中表达获得基因工程抗体。应用该技术, 本团队已成功获得牛源 FMDV 广谱反应性单克隆抗体 E32 和 FMDV O 型型内广谱中和单克隆抗体 C4<sup>[22]</sup>。本研究以 E32 为捕获抗体, 以生物素标记的 C4 为检测抗体, 建立检测 FMDV O 型中和抗体的固相阻断 ELISA 方法(neutralizing antibodies solid-phase blocking ELISA, NA-SPBE)。利用自然宿主牛源单克隆抗体有望提高 ELISA 检测自然宿主中和抗体的准确性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和设备

碳酸盐缓冲液(Sigma); TMB 底物溶液(SURMODICS); 辣根过氧化物酶标记亲和素(金斯瑞生物科技有限公司); 生物素(Thermo); FMDV O 型灭活抗原(中农威特生物科技股份有限公司); 口蹄疫病毒 LPB-ELISA 抗体检测试剂盒(中国农业科学院兰州兽医研究所)。96 孔酶标板(Costar); 酶标仪(BIO-RAD)。

### 1.2 抗体及血清样本

抗体 E32 和 C4 均由本实验室制备与保存<sup>[22]</sup>。健康非免疫动物血清共 86 份, 其中包括

牛血清 20 份、猪血清 44 份、羊血清 22 份, 经 LPB-ELISA 检测 O、A、Asia 1 型结构蛋白抗体均为阴性。感染动物血清样品共 140 份, 其中包括牛血清 89 份、羊血清 26 份、猪血清 25 份, 经 VNT 检测为 FMDV O 型阳性。FMDV A 型阳性牛血清共 20 份, 经 VNT 检测为 FMDV A 型阳性。FMDV Asia1 型阳性猪血清共 20 份, 经 VNT 检测为 FMDV Asia1 型阳性。牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)、小反刍兽疫病毒(PPRV)标准阳性血清各 10 份。待检临床样本 200 份, 包括牛血清 90 份、羊血清 40 份、猪血清 70 份。FMDV O 型灭活疫苗免疫动物血清 160 份, 其中包括牛血清 90 份、羊血清 39 份、猪血清 31 份。FMDV O 型灭活疫苗多次免疫牛血清共 95 份, 为 19 头牛每间隔 1 个月免疫 1 次, 每次免疫剂量为 12  $\mu\text{g}$ /头份, 连续免疫 3 次, 免疫前和每次免疫后 1 个月采血, 并在第 3 次免疫后间隔 2 个月采血 1 次。阳性对照血清采自 FMDV O 型感染后 1-3 个月的牛, 阴性对照血清采自非免疫健康牛。以上血清均由本实验室采集与保存。

### 1.3 抗体 C4 的生物素标记

取 1 mg 生物素加入到 180  $\mu\text{L}$  无酶水中, 吹打使其溶解混匀; 取 50  $\mu\text{L}$  完全溶解后的生物素, 加入到总量不超过 1 mg 的 C4 抗体中, 摇匀, 冰浴 4 h; 50 倍体积 PBS 溶液在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下透析 3 次, 每次 4 h, 使多余的生物素完全被置换, 标记好的抗体命名为 C4-Bio。

### 1.4 固相阻断 ELISA 反应条件确定

#### 1.4.1 抗体 E32 最适工作浓度及血清最佳稀释度的确定

以牛源单克隆抗体 E32 为捕获抗体, 以 FMDV O 型 146S 作为抗原 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 以生物素标记抗体 C4-Bio 为检测抗体, 不加血清, 反

应后加入酶标亲和素, 采用 TMB 显色液进行显色。采用方阵滴定方法, 确定各反应最适工作浓度: 抗体 E32 按 2.00、1.00、0.50、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作梯度稀释, 阴性和阳性对照血清按 1:8-1:1 024 作梯度稀释。读取  $OD_{450}$  值, 并计算 N/P 值(N: 阴性对照  $OD_{450}$  值, P: 阳性对照  $OD_{450}$  值), 当 N/P 值最大时最佳。

#### 1.4.2 C4-Bio 最适工作浓度及酶标亲和素最适稀释比例的确定

生物素标记抗体 C4-Bio 按 2.000、1.000、0.500、0.250、0.125、0.060、0.030、0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作梯度稀释, 酶标亲和素按 1:20 000、1:40 000、1:80 000 作梯度稀释。读取  $OD_{450}$  值, 并计算 N/P 值, 当 N/P 值最大时最佳。

#### 1.4.3 最适阻断条件及抗原最适捕获浓度的确定

阻断反应条件选取室温振荡 1 h、2 h 和过夜, 室温静置过夜以及 4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜, FMDV O 型灭活抗原, 抗原浓度选择 1.00、0.50、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 读取  $OD_{450}$  值, 并计算 N/P 值, 当 N/P 值最大时最佳。

#### 1.4.4 最适血清稀释液

实验准备有血清稀释液(2% BSA+2%山羊血清)与 1 $\times$ PBST 洗液 2 种, 读取  $OD_{450}$  值, 并计算 N/P 值, 当 N/P 值最大时最佳。

#### 1.4.5 操作步骤及抗体效价判定

操作步骤: 配制碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6), 稀释抗体 E32 至最适工作浓度, 加入酶标板, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  静置过夜; 捕获 A 型 FMDV 灭活抗原, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 室温静置 2 h; 配制 1% BSA+5%蔗糖溶液, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, 吹干, 抽真空保存; 加入待检血清样本, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ; 加入生物素标记抗体 C4-bio, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min; 加入酶标亲和素, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min; TMB 显色, 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  避

光反应 15 min; 终止并读取  $OD_{450}$  值。

计算血清样品抗体效价: 146S 抗原对照 4 孔, 弃去最高和最低  $OD_{450}$  值, 计算剩余 2 孔的平均  $OD_{450}$  值, 再除以 2, 即为临界值, 表示阻断 50% 反应的对照  $OD_{450}$  值。检测孔  $OD_{450}$  值大于临界值为阴性孔, 小于为阳性孔。以被检样本阳性孔的最高稀释倍数作为该份血清的抗体效价。

### 1.5 敏感性、特异性与临界值的确定

选取非免疫健康动物血清 86 份和 VNT 检测结果为 FMDV O 型阳性的动物血清 140 份, 用 NA-SPBE 方法检测上述血清样本, 统计血清样本的抗体效价, 通过对数据分析, 以确定 NA-SPBE 方法的临界值、特异性和敏感性。

### 1.6 重复性试验

使用同一批次制备的 146S 反应板, 在不同时间段检测相同的 12 份血清样本抗体效价 3 次, 评价该方法的批内变异系数; 使用不同批次制备的 146S 反应板, 在相同时间段检测相同的 12 份血清样本抗体效价 3 次, 评价该方法的批间变异系数。一般行业标准为批内变异系数小于 10%, 批间变异系数小于 15%。

### 1.7 交叉反应性试验

使用 NA-SPBE 方法检测 FMDV Asia1 型阳性血清和 FMDV A 型阳性血清各 20 份, BVDV、PRRSV、CSFV、PPRV 阳性血清各 10 份。统计检测结果, 确定该方法是否存在交叉反应。

### 1.8 NA-SPBE 与 VNT 相关性

使用 NA-SPBE 与 VNT 2 种方法, 检测 160 份 FMDV O 型灭活疫苗免疫血清抗体效价。统计检测结果, 通过 Pearson 系数检验来确定两者之间的相关系数, 当  $P < 0.05$  时具有统计学意义, 分析过程使用 GraphPad Prism 8 软件。VNT 的具体操作方法及结果判定参考

文献[23]。

## 1.9 NA-SPBE、LPBE 与 VNT 临床样本检测结果比较

使用 NA-SPBE、VNT 以及 LPBE 方法检测待检临床样本 200 份, 其中包括牛血清 90 份、羊血清 40 份、猪血清 70 份。比较 NA-SPBE、LPBE 与 VNT 检测结果, 并计算 NA-SPBE、LPBE 与 VNT 的符合率。

### 1.10 抗体消长规律

使用 NA-SPBE 方法检测 O 型灭活疫苗多次免疫牛血清。通过对血清样本的检测, 从而观察动物体内中和抗体水平消长变化, 为评价相关疫苗免疫效力提供依据。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗体 E32 最适工作浓度及血清最佳稀释度的确定

方阵滴定所测  $OD_{450}$  值及 N/P 值如表 1 所示, 当捕获抗体 E32 浓度为  $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、血清稀释比例为 1:32 时, N/P 值最高。因此, 抗体 E32 最适工作浓度为  $0.5 \mu\text{g/mL}$ , 血清最佳稀释度为 1:32。

### 2.2 C4-Bio 最适工作浓度及酶标亲和素最适稀释比例的确定

使用方阵滴定来确定 C4-Bio 及酶标亲和素最适工作浓度, 所测得  $OD_{450}$  值及 N/P 值见表 2。结果显示, 当 C4-Bio 浓度为  $0.06 \mu\text{g/mL}$ 、酶标亲和素稀释比例为 1:40 000 时, N/P 值最大。因此, 可以确定 C4-Bio 最适浓度为  $0.06 \mu\text{g/mL}$ , 酶标亲和素最适稀释比例为 1:40 000。

### 2.3 最适阻断条件及抗原最适捕获浓度的确定

使用方阵滴定来确定最适阻断条件及抗原最适捕获浓度, 所测得  $OD_{450}$  值及 N/P 值见表 3。结果显示, 当阻断条件为室温振荡过夜、

表 1 方阵滴定法确定捕获抗体 E32 及血清最佳稀释度( $OD_{450}$ )Table 1 The optimal dilution of captured antibody E32 and sera determined by checkerboard titration ( $OD_{450}$ )

Dilution ratio	E32 2.00/( $\mu\text{g/mL}$ )			E32 1.00/( $\mu\text{g/mL}$ )			E32 0.50/( $\mu\text{g/mL}$ )			E32 0.25/( $\mu\text{g/mL}$ )		
	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P	N	P	N/P
1:8	1.604	0.311	5.16	1.456	0.190	7.66	1.257	0.092	13.66	0.785	0.082	9.57
1:16	1.922	0.305	6.30	1.625	0.178	9.13	1.52	0.107	14.21	0.910	0.097	9.38
1:32	1.933	0.589	3.28	1.822	0.279	6.53	1.789	0.117	15.29	1.012	0.087	11.63
1:64	2.111	0.711	2.97	1.973	0.420	4.70	1.800	0.270	6.67	1.322	0.171	7.73
1:256	2.345	0.998	2.35	1.991	0.743	2.68	1.935	0.456	4.24	1.337	0.252	5.31
1:512	2.238	1.277	1.75	2.002	1.077	1.86	1.833	0.721	2.54	1.434	0.455	3.15
1:1 024	2.389	1.532	1.56	1.992	1.332	1.50	1.951	0.923	2.11	1.310	0.630	2.08

表 2 C4-Bio 最适工作浓度及酶标亲和素最适稀释比例的确定

Table 2 Determination of the optimal working concentration of C4-Bio and the optimal dilution ratio of streptavidin-HRP

C4-Bio concentration/( $\mu\text{g/mL}$ )	P(N)	Streptavidin-HRP 1:20 000		Streptavidin-HRP 1:40 000		Streptavidin-HRP 1:80 000	
		$OD_{450}$	N/P	$OD_{450}$	N/P	$OD_{450}$	N/P
2.000	P	0.833	–	0.660	5.25	0.615	4.52
	N	+		3.466		2.777	
1.000	P	0.759	–	0.555	5.82	0.556	4.63
	N	+		3.230		2.577	
0.500	P	0.522	6.19	0.479	6.10	0.411	5.39
	N	3.230		2.920		2.215	
0.250	P	0.412	7.31	0.378	6.64	0.378	5.58
	N	3.011		2.511		2.110	
0.125	P	0.336	8.36	0.227	10.35	0.229	8.66
	N	2.810		2.350		1.982	
0.060	P	0.271	10.25	0.132	15.98	0.201	8.77
	N	2.777		2.110		1.762	
0.030	P	0.220	11.90	0.121	13.39	0.115	13.51
	N	2.619		1.620		1.554	

+: the read value is out of the range; -: the result cannot be computed.

表 3 最适阻断条件及抗原最适捕获浓度的确定

Table 3 Determination of optimal blocking conditions and optimal capture concentration of antigen

Blocking conditions	P(N)	Antigen capture concentration						
		1.00 $\mu\text{g/mL}$		0.50 $\mu\text{g/mL}$		0.25 $\mu\text{g/mL}$		
		N/P	N/P	N/P	N/P	N/P	N/P	
Room temperature oscillation	1 h	P	0.435	3.86	0.360	4.57	0.331	4.30
		N	1.677		1.644		1.422	
	2 h	P	0.336	5.21	0.222	7.61	0.248	6.14
		N	1.750		1.689		1.522	
Overnight	P	0.287	6.18	0.201	8.51	0.126	12.71	
	N	1.774		1.710		1.602		
Stand at room temperature overnight	P	0.323	4.99	0.277	6.26	0.220	7.22	
	N	1.611		1.733		1.589		
Stand at 4 °C overnight	P	0.307	5.65	0.217	7.78	0.245	6.57	
	N	1.734		1.688		1.610		

抗原捕获浓度为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, N/P 值最大。因此, 可以确定最适阻断条件为室温振荡过夜, 抗原最适捕获浓度为 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2.4 最适血清稀释液

实验测得  $OD_{450}$  值以及 N/P 值见表 4。结果显示, 当选择实验室自制血清稀释液时, N/P 值最高。因此选择实验室自制血清稀释液作为最适血清稀释液。

表 4 最适血清稀释液

Table 4 Optimal serum diluent

Diluent	Serum diluent		PBST	
	P	N	P	N
$OD_{450}$	0.125	1.775	0.210	1.651
N/P	14.20		7.82	

## 2.5 敏感性、特异性与临界值的确定

使用 NA-SPBE 方法, 检测非免疫健康动物血清 86 份和经 VNT 检测确认为 FMDV O 型阳性的动物血清 140 份。其中非免疫健康猪血清中, 3 份抗体效价为 0.9  $\log_{10}$ , 4 份抗体效价为 1.2  $\log_{10}$ , 1 份抗体效价为 1.5  $\log_{10}$ , 其余抗体效价  $<0.9 \log_{10}$ 。阳性血清有 4 份血清抗体效价

为 1.2  $\log_{10}$ , 其余抗体效价均  $\geq 1.5 \log_{10}$  (图 1A)。经过 ROC 曲线分析, 当 Cut-off 值为 1.35  $\log_{10}$  时, AUC 具有最大面积 0.998, 此时敏感性为 97.14%, 特异性为 98.84% (图 1B)。因此确定临界值为 1.35  $\log_{10}$ 。

然而, 在对上述血清实际检测过程中发现, 阴阳性血清在抗体效价 1.2  $\log_{10}$  与 1.5  $\log_{10}$  之间出现了交叉现象(图 1A), 故在结果判定时需设置可疑区间。当血清抗体效价  $\leq 1.2 \log_{10}$  时, 结果判定为阴性, 当血清抗体效价  $>1.5 \log_{10}$  时, 结果判定为阳性, 而当血清抗体效价处在 1.2  $\log_{10}$  与 1.5  $\log_{10}$  之间, 则结果判定为可疑, 需重新测定, 若第二次检测仍为可疑, 则结果判定为阳性。

## 2.6 重复性试验

使用同一批次制备的 146S 反应板, 在不同时间段检测相同的 12 份血清样本 3 次, 结果显示批内变异系数均低于 10%, 使用不同批次制备的 146S 反应板, 在相同时间段检测相同的 12 份血清样本 3 次, 结果显示批间变异系数均低于 10% (表 5)。表明该方法的重复性良好。

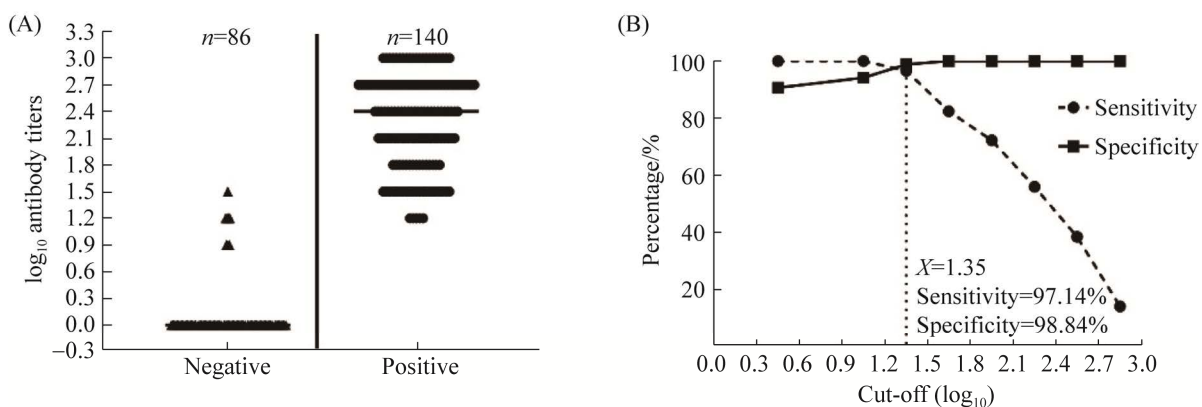


图 1 NA-SPBE 临界值的确定及敏感性、特异性的测定

Figure 1 Determination of the Cut-off value, sensitivity and specificity of the NA-SPBE. A: neutralizing antibody titers of negative sera and positive sera; B: the Cut-off value, sensitivity and specificity of the NA-SPBE.

表 5 重复性实验结果( $\log_{10}$  抗体效价)Table 5 Repeatability test results of NA-SPBE ( $\log_{10}$  antibody titer)

Serum number	Intra-batch			Inter-batch		
	Average value	SD	CV/%	Average value	SD	CV/%
1	1.8	0.000	0.00	1.9	0.142	7.44
2	1.6	0.142	8.84	1.6	0.142	8.84
3	1.7	0.142	8.32	1.6	0.142	8.84
4	2.1	0.000	0.00	2.0	0.142	7.07
5	2.4	0.000	0.00	2.4	0.000	0.00
6	1.7	0.142	8.32	1.8	0.000	0.00
7	2.8	0.142	5.05	2.8	0.142	5.05
8	2.7	0.000	0.00	2.6	0.142	5.44
9	0.9	0.000	0.00	0.9	0.000	0.00
10	1.2	0.000	0.00	1.2	0.000	0.00
11	2.9	0.142	4.88	2.9	0.142	4.88
12	2.2	0.142	6.43	2.2	0.142	6.43

## 2.7 交叉反应性试验

使用 NA-SPBE 方法检测 FMDV Asia1 型阳性血清和 FMDV A 型阳性血清各 20 份, BVDV、PRRSV、CSFV、PPRV 阳性血清各 10 份。检测结果如图 2 所示, FMDV Asia1 型、FMDV A 型、BVDV、PRRSV、CSFV、PPRV 阳性血清的抗体效价均  $\leq 1.2 \log_{10}$ , 因而判定检测结果均为阴性, 未出现交叉反应。

## 2.8 NA-SPBE 与 VNT 相关性

使用 NA-SPBE 与 VNT 方法检测 160 份 FMDV O 型免疫血清抗体效价, NA-SPBE 检测

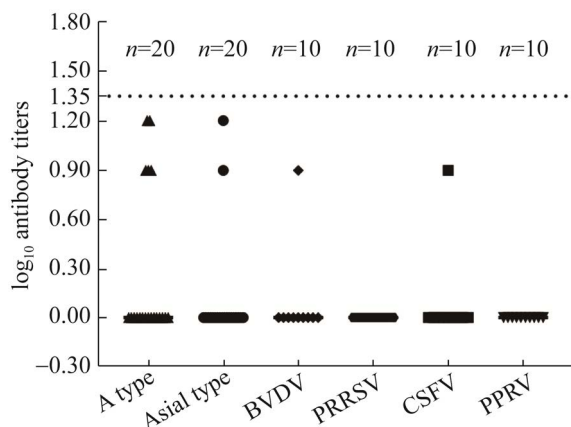


图 2 NA-SPBE 的交叉反应性

Figure 2 The cross-reactivity of NA-SPBE.

出 15 份血清抗体效价  $< 1.35 \log_{10}$ , 其余血清均  $> 1.35 \log_{10}$ , VNT 检测出 20 份血清抗体效价  $< 1.65 \log_{10}$  (VNT 临界值), 其余血清均  $\geq 1.65 \log_{10}$  (图 3A)。使用 GraphPad Prism 8 软件分析 2 种方法的相关性。结果显示, 两者的相关系数  $r$  为 0.807 5,  $P < 0.000 1$ , 2 种方法呈显著相关 (图 3B)。表明 NA-SPBE 代替 VNT 进行大量血清样本的检测是可行的。

## 2.9 NA-SPBE、LPBE 与 VNT 临床样本检测结果比较

使用 NA-SPBE、VNT 以及 LPBE 方法分别检测待检临床样本 200 份。结果显示, VNT 检测出阳性血清 112 份、阴性血清 88 份, LPBE 检测出阳性血清 122 份、阴性血清 78 份, NA-SPBE 检测出阳性血清 116 份、阴性血清 84 份。NA-SPBE 与 VNT 阳性符合率为 96.49%, 阴性符合率为 95.35%, 总符合率为 96%。LPBE 与 VNT 阳性符合率为 92.31%, 阴性符合率为 89.16%, 总符合率为 91%。具体数据见表 6。以上结果表明, LPBE 和 NA-SPBE 2 种方法与 VNT 的符合率都很高, 而 NA-SPBE 相较于 LPBE, 检测结果更接近于 VNT。



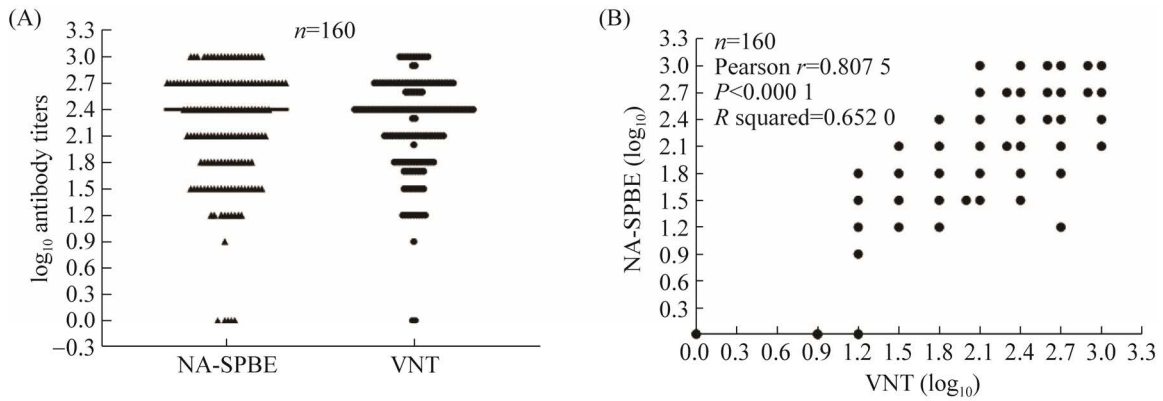


图 3 NA-SPBE 与 VNT 检测结果的相关性分析

Figure 3 Correlation analysis of results determined by NA-SPBE and VNT. A: neutralizing antibody titers of sera detected by NA-SPBE and VNT; B: correlation analysis of results determined by NA-SPBE and VNT.

表 6 NA-SPBE 与 VNT、LPBE 临床样本检测结果

Table 6 Results of NA-SPBE, VNT and LPBE clinical samples

Detection method	Sample quantity	Positive quantity	Coincidence quantity	Negative quantity	Coincidence quantity
VNT	200	112	110	88	82
NA-SPBE		116		84	
Coincidence rate/%	96.00	96.49		95.35	
VNT	200	112	108	88	74
LPBE		122		78	
Coincidence rate/%	91.00	92.31		89.16	

### 2.10 抗体消长规律

使用 NA-SPBE 方法检测 O 型灭活疫苗免疫前至第 3 次免疫血清以及第 3 次免疫后间隔 2 月血清。结果显示，动物体内中和抗体水平，随免疫次数增加而升高，一般在第 2 次免疫或第 3 次免疫达到最高，而在免疫结束后第 2 月，中和抗体水平又开始下降(图 4)。从而可以看出，NA-SPBE 方法能够很好地检测出免疫动物体内中和抗体水平变化，为评价疫苗的免疫效力提供数据支撑。

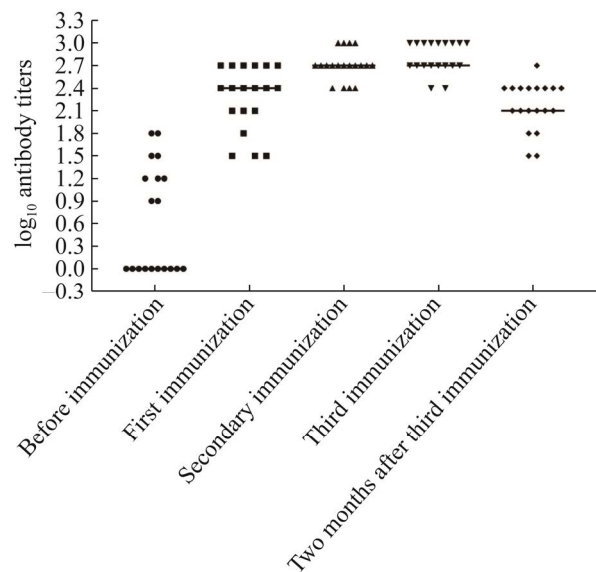


图 4 动物免疫后体内中和抗体消长

Figure 4 Neutralizing antibodies fluctuation after animal immunization.

## 3 讨论

FMDV O 型是目前危害最为严重的血清型，具有高度抗原变异，可分为 11 个拓扑型<sup>[24]</sup>，目前在我国流行的有东南亚拓扑型(SEA)、中东-南亚

(ME-SA)拓扑型与嗜猪的 O/Cathay 拓扑型, ME-SA 拓扑型中又有 PanAsia 和 IND2001 这 2 个谱系<sup>[25]</sup>。病毒变异导致疫苗毒株很难与流行毒株相匹配。因此, 为了提高疫苗保护效果, 需要经常更新疫苗毒株<sup>[26-27]</sup>。为解决 FMDV 抗原多样性问题, 本研究选用了 FMDV 广谱反应性单克隆抗体 E32 为捕获抗体, 其可与 FMDV O 型、Asia1 型及 A 型的所有代表流行毒株发生反应。选用 FMDV O 型型内广谱中和抗体 C4 为检测抗体, 该抗体识别抗原表位位于 FMDV O 型衣壳蛋白 VP3 上, VP3 变异比较大, 仅有 39% 的氨基酸保守, 其大多数氨基酸集中在 55-88 位氨基酸、130-140 位氨基酸、176-186 位氨基酸、196-208 位氨基酸这 4 个区域<sup>[28]</sup>。而抗体 C4 关键氨基酸为  $\beta$ B 上 T65、B-C 环上 T68、E-F 环上 E131 和 K134、H-I 环上 G196<sup>[13]</sup>, 处在 VP3 保守区域, 且可中和我国流行的 3 个拓扑型 4 个谱系的代表毒株。因此, 当用 NA-SPBE 检测血清中 FMDV 的中和抗体时, 只需更新 146S 抗原以匹配新的流行株, 不需要更新单克隆抗体。另外, E32 和 C4 都是通过单个 B 细胞抗体技术制备, 此方法避免了复杂的杂交瘤融合和筛选过程, 抗体制备较简单、快速, 可以为检测方法提供充足且稳定的抗体试剂。而且, 检测抗体 C4 为中和抗体, 这也保证了本研究建立的 NA-SPBE 检测到的抗体也是中和抗体。

目前, 使用灭活疫苗进行预防性或紧急疫苗接种是流行地区控制口蹄疫的主要措施, 因而准确对疫苗免疫效力的评价也至关重要。已有研究表明, 动物接种疫苗后体内的中和抗体滴度与它们抵抗病毒攻击的能力之间有很好的相关性<sup>[29-31]</sup>。动物在接种 FMD 疫苗后能产生针对 FMDV 的中和抗体, 该抗体能与细胞外游离的病毒粒子结合, 从而消除病毒的感染能

力, 在阻止病毒感染和传播中起到重要作用<sup>[32]</sup>。其作用机制主要有封闭病毒表面抗原、改变病毒表面结构、与病毒形成能被巨噬细胞清除的免疫复合物和激活补体裂解病毒等<sup>[33]</sup>。

在检测动物体内中和抗体效价时, VNT 是检测 FMDV 中和抗体的标准方法, 但该方法操作繁琐、工作量大、耗时长, 不适合高通量的检测。而 NA-SPBE 操作方便、耗时短, 具有良好的特异性和敏感性, 当临界值为  $1.35 \log_{10}$  时, 敏感性为 97.14%, 特异性为 98.84%, 批间变异系数和批内变异系数均低于 10%, 具有良好的重复性, 且与 FMDV A 型、FMDV Asia1 型、BVDV、PRRSV、CSFV、PPRV 不存在交叉反应。在检测中和抗体效价时, NA-SPBE 与 VNT 检测的抗体效价相关系数  $r$  为 0.807 5,  $P < 0.000 1$ , 具有显著相关性, 且两者符合率为 96%, 表明 NA-SPBE 代替 VNT 进行大量血清样本的检测是可行的。

传统 LPBE 虽具有敏感性高、重复性好、操作便捷等优点, 但结果易出现假阳性, 且抗原需单独冷冻保存, 运输过程容易降解, 影响实验结果。NA-SPBE 除具备 LPBE 优点外, 其所检测抗体为中和抗体, 特异性更强, 抗原已捕获至酶标板上, 更加稳定, 便于运输。在 NA-SPBE 与 LPBE 结果比较中可以看出, NA-SPBE 与 VNT 的符合率为 96%, 高于 LPBE 的 91%。

除上述外, NA-SPBE 在检测连续免疫动物血清时, 可以清晰准确地反映出动物体内中和抗体水平的消长变化。为评价 FMD 疫苗的免疫效力, 指导免疫接种提供有力的数据支撑。

## 参考文献

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17: 465-493.
- [2] Knight-Jones TJ, Rushton J. The economic impacts of foot and mouth disease—what are they how big are

- they and where do they occur? *Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 112: 161–173.
- [3] Brito BP, Rodriguez LL, Hammond JM, Pinto J, Perez AM. Review of the global distribution of foot-and-mouth disease virus from 2007 to 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(2): 316–332.
- [4] 刘在新. 全球口蹄疫防控技术及病原特性研究概观. *中国农业科学*, 2015, 48(17): 3547–3564.  
Liu ZX. Progress and prospect of the technologies to control foot-and-mouth disease and its pathogen characteristics worldwide. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(17): 3547–3564. (in Chinese)
- [5] 刘俊林, 祁淑芸, 马军武, 崔燕. 液相阻断 ELISA 在口蹄疫病毒抗体水平检测中的应用. *甘肃农业大学学报*, 2008, 43(3): 18–20.  
Liu JL, Qi SY, Ma JW, Cui Y. Application of liquid-phase blocking ELISA in the detection of antibody levels against foot-and-mouth disease virus. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2008, 43(3): 18–20. (in Chinese)
- [6] Mackay DK, Bulut AN, Rendle T, Davidson F, Ferris NP. A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*, 2001, 97(1/2): 33–48.
- [7] Aggarwal N, Barnett PV. Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV): an analysis of the specificities of anti-FMDV antibodies after vaccination of naturally susceptible host species. *The Journal of General Virology*, 2002, 83(pt 4): 775–782.
- [8] 肖啸, 杨继生, 张静, 程纬. 口蹄疫诊断技术的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(2): 78–81.  
Xiao X, Yang JS, Zhang J, Cheng W. Foot-and-mouth disease diagnostic technology research progress. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 35(2): 78–81. (in Chinese)
- [9] Haas B. Application of the FMD liquid-phase blocking sandwich ELISA. Problems encountered in import/export serology and possible solutions. Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Vienna, Austria, 1994: 124–127.
- [10] Cao Y, Li K, Wang S, Fu Y, Sun P, Li P, Bai X, Zhang J, Ma X, Xing X, Zhou S, Bao H, Li D, Chen Y, Li Z, Lu Z, Liu Z. Implication of broadly neutralizing bovine monoclonal antibodies in the development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting neutralizing antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 57(12): e01030-19.
- [11] Paiba GA, Anderson J, Paton DJ, Soldan AW, Alexandersen S, Corteyn M, Wilsden G, Hamblin P, MacKay DK, Donaldson AI. Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *Journal of Virological Methods*, 2004, 115(2): 145–158.
- [12] Sevik M, Ozturk FF. Comparative evaluation of liquid-phase blocking ELISA and solid-phase competition ELISA methods for the detection of antibodies to the structural proteins of foot-and-mouth disease types O and A viruses. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2013, 37: 523–528.
- [13] Li K, He Y, Wang L, Li P, Wang S, Sun P, Bao H, Cao Y, Liu X, Zhu G, Song Y, Bai X, Ma X, Fu Y, Yuan H, Zhang J, Wang J, Chen Y, Li D, Lou Z, Liu Z, Lu Z. Two cross-protective antigen sites on foot-and-mouth disease virus serotype O structurally revealed by broadly neutralizing antibodies from cattle. *Journal of Virology*, 2021, 95(21): e0088121.
- [14] Chuck AS, Palsson BO. Population balance between producing and nonproducing hybridoma clones is very sensitive to serum level, state of inoculum, and medium composition. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39(3): 354–360.
- [15] Couture ML, Heath CA. Relationship between loss of heavy chains and the appearance of nonproducing hybridomas. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 47(2): 270–275.
- [16] Merritt SE, Palsson BO. Loss of antibody productivity is highly reproducible in multiple hybridoma subclones. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42(2): 247–250.
- [17] Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, Reid SM, King DP, Ebert K, Paton DJ, Kristersson T, Brocchi E, Grazioli S, Merza M. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *Journal of Virological Methods*, 2009, 155(1): 10–17.
- [18] Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *eLife*, 2008, 329(1/2): 112–124.
- [19] Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski

- H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature*, 2009, 458(7238): 636–640.
- [20] Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Walker BD, Pereyra F, Cutrell E, Seaman MS, Mascola JR, Wyatt RT, Wardemann H, Nussenzweig MC. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. *Journal of Immunological Methods*, 2009, 343(2): 65–67.
- [21] Pan X. Single cell analysis: from technology to biology and medicine. *Single Cell Biology*, 2014, 3(1): 106.
- [22] Li K, Wang S, Cao Y, Bao H, Li P, Sun P, Bai X, Fu Y, Ma X, Zhang J, Li D, Chen Y, Liu X, An F, Wu F, Lu Z, Liu Z. Development of foot-and-mouth disease virus-neutralizing monoclonal antibodies derived from plasmablasts of infected cattle and their germline gene usage. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2870.
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1181.2-2003. 口蹄疫病毒抗体检测方法微量血清中和试验. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [24] Mahapatra M, Parida S. Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. *Expert Review of Vaccines*, 2018, 17(7): 577–591.
- [25] 王省. 利用单个 B 细胞抗体技术研制口蹄疫病毒 O 型全牛源单克隆工程抗体. 中国农业科学院硕士学位论文, 2019.
- [26] De Los Santos T, Diaz-San Segundo F, Rodriguez LL. The need for improved vaccines against foot-and-mouth disease. *Current Opinion in Virology*, 2018, 29: 16–25.
- [27] Mahapatra M, Yuvaraj S, Madhanmohan M, Subramaniam S, Pattnaik B, Paton DJ, Srinivasan VA, Parida S. Antigenic and genetic comparison of foot-and-mouth disease virus serotype O Indian vaccine strain, O/IND/R2/75 against currently circulating viruses. *Vaccine*, 2015, 33: 693–700.
- [28] 刘湘涛, 张强, 郭建宏. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [29] Pay TW, Hingley PJ. The use of serum neutralizing antibody assay for the determination of the potency of foot and mouth disease (FMD) vaccines in cattle. *PLoS One*, 1986, 64: 153–161.
- [30] Ahl R, Haas B, Lorenz RJ, Wittman G. Alternative potency test of FMD vaccines and results of comparative antibody assays in different cell systems and ELISA. *Report of the meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, FAO, Rome, Italy*, 1990: 51–60.
- [31] Pay TW, Hingley PJ. Foot and mouth disease vaccine potency tests in cattle: the interrelationship of antigen dose, serum neutralizing antibody response and protection from challenge. *Protoplasma*, 1992, 10(10): 699–706.
- [32] Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, Briand JP, Muller S, Prato M, Bianco A. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(10): 961–966.
- [33] Kennedy-Stoskopf S, Narayan O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanism of action and possible role in virus persistence. *Environmental Health*, 1986, 59(1): 37–44.