
1 附件：基于假病毒的中和抗体检测法指导原则公示稿

2

3 **基于假病毒的中和抗体检测法指导原则（草案）**

4

5 基于假病毒的中和抗体检测法，是指采用人工制备的含相应活病毒
6 膜蛋白以及报告基因的复制缺陷型假病毒，模拟实测病毒感染过程，利
7 用中和抗体对假病毒的阻断作用，通过检测假病毒所携带报告基因的表
8 达情况，检测供试品的中和抗体滴度的方法。对已有活病毒检测方法
9 的，其检测结果与基于活病毒的中和抗体检测方法的检测结果具有高度
10 相关性。该法可避免直接使用活病毒，解决了中和抗体检测中部分活病
11 毒不能培养和难于获取的问题，同时降低了实验操作环境的生物安全等
12 级要求。

13 本指导原则是对基于假病毒的中和抗体检测法所用假病毒的构建、
14 制备和质量控制，以及检测方法建立和验证的相关技术指导原则。可用
15 于单抗、疫苗等生物制品质量控制和临床试验样本中和抗体检测等。

16 使用者应坚持分析方法质量源于设计的理念，进行科学合理的方法
17 验与设计，保证分析方法在整个生命周期中能始终符合预期目的。

18 **一、假病毒的制备**

19 **（一）假病毒构建策略**

20 **1. 假病毒包装组件的选择**

21 **（1）质粒：**对于包膜病毒，如新型冠状病毒、狂犬病病毒、汉坦
22 病毒等，常用水疱口炎病毒（Vesicular Stomatitis Virus, VSV）、
23 人类免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）等包装体
24 系。可根据需求，选择合适的假病毒骨架质粒，并选择与病毒感染相
25 关的膜结构蛋白，如新型冠状病毒的刺突蛋白（Spike, S）、狂犬病

26 病毒的糖蛋白 (glycoprotein, G) 等, 其蛋白表达序列应具有代表性。
27 为了提高假病毒的滴度, 可通过密码子优化、构建胞内截短体等方式
28 改造膜蛋白表达质粒, 但应确保其中和抗体作用区域不发生改变。对
29 每一批表达质粒需进行核苷酸序列测定, 证实其与设计序列一致; 测
30 定质粒浓度、纯度等关键指标, 以保障转染效率。

31 对于无包膜病毒, 如: 如人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus,
32 HPV)、手足口病毒 (Enterovirus71, EV71) 等, 通常利用病毒自身
33 的结构蛋白构建假病毒。

34 **(2) 报告基因:** 可基于不同的检测仪器、检测信号的灵敏度、
35 是否需要多种信号同时检测等, 选择化学发光报告基因 (如萤火虫荧
36 光素酶)、荧光报告基因 (如不同荧光蛋白) 或其他检测信号。在进
37 行多种中和抗体联合检测时, 应选择抗原性无交叉的待测假病毒组合,
38 且选择信号之间无交叉反应的检测报告基因。在多重信号检测方法开
39 发时, 应与单一信号检测方法进行比较验证。

40 **(3) 包装用细胞:** 应根据病毒及表达质粒的特性, 选择适宜的
41 细胞用于假病毒包装。如包装狂犬病病毒假病毒通常采用 293T 细胞,
42 HPV 假病毒通常采用 293FT 或 293TT 细胞。

43 2. 包装方法优化

44 假病毒包装方法建立时, 应设定合理的预设标准, 进行风险评估,
45 风险识别排序, 可采用实验设计 (Design of experiment, DoE), 对
46 包装用细胞、转染质粒剂量和比例、转染试剂、转染时间、假病毒收
47 获时间等步骤进行优化和耐用性考察, 从而获得滴度较高的假病毒,
48 并确定方法可操作设计区域 (Method Operable Design Region,
49 MODR)。

50 (二) 假病毒库的制备

51 1. 包装用细胞制备

52 应根据生产需求准备适量包装用细胞，并控制传代次数。进行质
53 粒转染前，细胞状态良好、密度通常需达到 70%–90%。

54 2. 质粒转染和骨架病毒感染

55 将膜蛋白表达质粒、骨架质粒/骨架病毒按照合适的比例进行转染
56 /感染。常用的转染试剂包括脂质体 2000/3000 (lipofectamine
57 2000/3000) 和聚醚酰亚胺 (Polyethyleneimine, PEI) 等，具体可
58 参考所选择转染试剂的使用说明操作。

59 3. 培养收获和储存

60 转染后培养适宜时间应更换新鲜培养基，并根据包装体系的不同
61 选择合适的假病毒收获时间。采用 VSV 包装体系可在换液后 1-2 天收
62 取含假病毒的上清液；采用 HIV 包装体系可在换液后 2-3 天收取含假
63 病毒的上清液；HPV 自组装假病毒可在换液后 2-3 天收获细胞，采用
64 裂解液裂解细胞以释放 HPV 假病毒。含假病毒的上清经过滤或离心，
65 分装并贮存于-70℃以下，避免反复冻融（参考验证结果），必要时可
66 采取冻干的方式。

67 (三) 假病毒库的质控

68 为了保障检测结果的一致性和可比性，应以毒株为单位建立假病
69 毒库。对一次实验制备的假病毒定义为一批假病毒库。如果使用不同
70 批次假病毒，应采用检测固定样品（如标准品或内控品），对假病毒
71 批间差异进行评价，保障检测结果的一致性。

72 对假病毒库应设定适宜的质量标准进行控制，包括但不限于假病
73 毒鉴别、滴度、外源污染检查（如假病毒感染后细胞的无菌、支原体
74 检测）、标准血清或内控品检测等项目，并按照假病毒的稳定性实验
75 结果，进行保存、定期监测。稳定性监测项目应至少包括假病毒滴度。

76 假病毒滴度测定时通常将假病毒按照一定比例系列稀释，选择合
77 适的阴阳性临界值（Cut off 值），判断各稀释度下病毒稀释孔的阴
78 阳性。用 Spearman Kaerber 法、Reed-Meunch 法或其它适宜方法计算
79 病毒滴度；或采用线性回归的方式，确立病毒稀释倍数与检测信号之
80 间的关系，根据检测信号值的要求确定病毒的稀释倍数。

81 二、基于假病毒的中和抗体检测

82 基于假病毒的中和抗体检测方法的建立，应综合考虑所构建的假
83 病毒、选用的细胞基质、检测体系及针对的供试品/检测目的等特点进
84 行开发，合理设计和优化试验步骤和相关参数，并通过充分优化后使
85 用。应根据样品、假病毒、检测用细胞等要求，在合适的生物安全实
86 验室进行，对检测样品有更高生物安全要求的，按照样品的要求执行。
87 方法学的建立和验证，应设置合适的预设标准，应至少包括精密度、
88 准确度和专属性等指标。方法建立后，对方法持续监测，按实际情况
89 及时进行分析方法变更。

90 （一）方法建立

91 应根据检测目的进行合理的实验方案设计，方法建立时，应对关
92 键步骤进行优化，如中和抗体检测用细胞的选择、细胞加入量、细胞
93 加入方式；供试品、对照品或内控品的准备；假病毒加入量和孵育时
94 间；目标指示物的检测等。试验基本步骤、参数及风险评估要点如下：

95 1. 检测用细胞的准备

96 依据病毒的宿主嗜性及实验筛选选择检测用细胞。优化假病毒接
97 种方式，如细胞板孔中先接种细胞，后加入供试品和假病毒；或先加
98 入供试品和假病毒，后加入细胞。对于细胞培养时间较长的实验（2
99 天以上）应考虑边缘孔的蒸发影响。可避免使用细胞板的边缘孔，并
100 向其中加入无菌液体（如无菌水、磷酸盐缓冲液或培养基等），以维

101 持细胞培养环境的湿度。检测用细胞、细胞接种浓度范围均应在建立
102 方法时进行风险评估、优化及验证。

103 2. 供试品、对照品和内控品的稀释

104 供试品若为人或动物血清，应预先进行 56℃，30 分钟处理，以消
105 除血清中除抗体以外其他免疫因子的影响。通常每个供试品每一浓度
106 点设置两个及以上复孔。每次试验均应设置细胞对照（仅加入细胞）
107 和假病毒对照（加入细胞和假病毒）；同时应采用对照品进行监测，
108 以确保试验结果的准确性。可采用国际/国家标准品或经国际/国家标
109 准品标定的内控品作为对照品，对照品通常应与供试品同质，特殊情
110 况下如无同质标准品，可采用其他动物免疫后的阳性血清替代。

111 3. 假病毒加入和孵育

112 将一定稀释度的假病毒，加入稀释好的供试品、标准品或内控品，
113 混合均匀后，与待检测细胞共培养。应根据假病毒的具体特性，选择
114 细胞与假病毒的共培养时间，如 VSV 载体的假病毒中和实验一般为 24
115 小时，HIV 骨架的假病毒中和实验一般为 48-72 小时。合适的假病毒
116 加入量及共孵育时间，应在方法建立时进行优化及验证。

117 4. 报告基因检测

118 若目标指示物为荧光蛋白，可应用酶联斑点计数器直接进行计数
119 分析。若目标指示物为荧光素酶报告基因，则需加入特定的底物及裂
120 解液，经充分反应后，在一定时间内采集化学发光信号。应设置合理
121 检测条件和检测仪器参数，在同一个分析项目中，检测条件和检测仪
122 器参数应保持一致。

123 (二)方法验证

124 优化后的方法应该进行专属性、相对准确度，精密度，线性和范
125 围等方法学验证。具体可参照“生物制品生物活性/效价测定方法验证

126 指导原则”（通则 9401）。对重大新突发传染病如果缺乏临床样品，
127 可以采用动物免疫血清进行验证，但应证明该方法对动物血清具有较
128 好的专属性。对涉及临床样品的检测方法验证，应考虑样本稳定性。

129 （三）关键质控点

130 假病毒包装细胞和检测细胞应参考“生物制品生产检定用动物细
131 胞基质及质量控制”的相关要求进行质控，应至少包括细胞遗传学检
132 测（如细胞 STR 分型，short tandem repeat, STR），无菌、支原体
133 检查。应参考验证结果控制关键的试验步骤，形成 MODR，如检测时间、
134 细胞代次等。应对关键试剂应进行质量控制，如：假病毒、牛血清（灭
135 能）、化学发光底物等。关键试剂换批时，应采用内控品进行评价，
136 检测结果应在规定的范围内。

137 （四）实验成立条件及复测原则

138 为了保障实验结果的准确、可比，应确定实验成立标准，如病毒
139 对照与细胞对照的信号比值、病毒对照信号值范围、阳性质控品的合
140 格区间等。实验的复测原则可包括逆梯度（检测结果倒置，即同一样
141 本高稀释度感染抑制率大于或等于 50%，而低稀释度感染抑制率小于
142 50%）、平行复孔间抑制率变异度超过 30%、ID₅₀ 结果超过最高稀释度
143 或低于最低稀释度等。

144 三、数据分析

145 数据分析贯穿方法开发、验证和应用的全过程，应符合《生物
146 检定统计法》（通则 1431）相关要求。

147 应采用科学的、经过验证的方法进行中和抗体滴度计算，如四参
148 数曲线拟合、Reed-Muench 法等，报告中和抗体的半数有效浓度 EC₅₀
149 或半数有效稀释倍数 ID₅₀。若实验中加入国家标准品、国际标准品或
150 者内控品，可计算相应的国家标准单位值（U 值）或国际标准单位值

151 (IU 值)。

152 对需要判定 Cut-off 值的实验，应选择与供试品背景相近的阴性
153 样品作为 Cut-off 值确定的阴性样本来源，采用适宜的方法确定
154 Cut-off 值。

155 四、应用

156 基于假病毒的中和抗体检测法主要用于检测单抗、疫苗等生物制
157 品效力评价和临床实验的免疫原性评价，检测样本可以为单克隆抗体、
158 人体血清或者动物血清。

159 本原则为假病毒中和抗体检测方法的通用原则，应用时应考虑具
160 体需要和产品的个性化要求。如应用于单抗制品和血清检测时应选择
161 单抗或血清等同质内控品；应用于疫苗体内效力评价时可以选用参考
162 疫苗，计算疫苗体内相对效力，或采用系列稀释的疫苗免疫动物，计
163 算 ED_{50} 。

164

165

166

167

168

169

170 起草单位：中国食品药品检定研究院

171 电 话：010-53851698