

---

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达  
8 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%、ID<sub>50</sub> 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 EC<sub>50</sub>  
149 或半数有效稀释倍数 ID<sub>50</sub>。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