病毒类产品感染性滴度检测方法研究进展

田清雅[1,2]，王自强[2]，邵　泓[2]*

（1. 复旦大学药学院，上海 201203；2. 上海市食品药品检验研究院，国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室，上海 201203）

摘要：病毒载体类疫苗产品、经慢病毒转导的 CAR-T 产品和以腺相关病毒为载体的基因治疗产品等病毒类产品种类的不断增加，产品的多样性和生产方式的复杂化，给生产单位和监管机构的质量控制和监督管理带来了新的挑战。针对病毒类产品，需要在生产和放行过程中对其纯度和活性等进行检验。感染性滴度作为病毒类产品的关键质量属性之一，在评估病毒类产品的安全性和有效性方面具有重要作用。该文主要总结了现有病毒感染性滴度定量方法的原理和应用，其中包括蚀斑法、半数组织培养感染量、荧光灶法、各类聚合酶链式反应、流式细胞术、纳米流式细胞术等。通过对这些方法进行介绍和比较，有利于生产企业和监管机构在不同的应用情况下选择合适的方法确保产品质量。

关键词：病毒类产品；感染性病毒；滴度检测；研究进展

中图分类号：Q93-33；Q782　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)11-1485-08

引用：田清雅，王自强，邵　泓．病毒类产品感染性滴度检测方法研究进展 [J]．中国医药工业杂志，2024, 55(11): 1485-1492.

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.004

Advances in the Detection Methods of Infectious Titers in Viral Products

TIAN Qingya[1,2], WANG Ziqiang[2], SHAO Hong[2]*

(*1. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 2. NMPA Key Lab. for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: The continuous proliferation of viral products, such as viral vector vaccines, CAR-T products produced by lentiviral transduction, and adenovirus-based gene therapy products, has presented novel challenges for manufacturing units and regulatory agencies in terms of quality control and supervision due to the complexity of production methods and diversity of products. To ensure the purity, activity, and other quality attributes of viral products, it is imperative to conduct inspections during the production and release processes. The infectious titer, as one of the key quality attributes, holds significant importance as it allows for the evaluation of safety and efficacy. This review provides a comprehensive summary of the principles and applications of existing methods for quantifying virus infectivity, including plaque assay, 50% tissue culture infectious dose, fluorescent focus assay, various polymerase chain reactions, flow cytometry, and nano-flow cytometry (nFCM). By introducing and comparing these methods, manufacturing companies and regulatory agencies can make informed decisions regarding the selection of appropriate techniques to ensure product quality in different application scenarios.

Key Words: viral product; infectious virus; titer detection; research progress

近年来，随着现代生物技术的不断发展，病毒载体类疫苗产品、经慢病毒转导的 CAR-T 产品和以腺相关病毒为载体的基因治疗产品等病毒类产品的研发与应用水平逐步提升。病毒类产品在生产和质量控制过程中的安全性和有效性问题值得密切关注。

收稿日期：2023-11-18

作者简介：田清雅（1997—），女，硕士研究生，专业方向：生物制品生物学活性分析方法研究。

通信作者：邵　泓（1969—），女，主任药师，硕士生导师，从事药品质量检测方法研究和开发。

E-mail：shaohong@smda.sh.cn

滴度作为衡量病毒类产品生物学活性、含量及稳定性等指标的重要检测项目，在相关产品生产的全生命周期中发挥着重要作用。通过准确测定滴度，可以确保病毒类产品的质量和稳定性符合要求，为其在预防、诊断和治疗疾病方面的有效性提供有力支持。因此，在生产过程中需要采取适当的方法和措施来准确测定滴度，并严格遵守相关的质量控制标准和监管要求，以确保此类产品的安全、有效。

滴度检测包括物理滴度检测和感染性滴度检测。物理滴度是指样本中存在的病毒的总颗粒数，通常使用各类物理、化学方法进行测量，如高效液相色谱法[1]、电镜及各类纳米技术[2]等。物理滴度的检测并不考虑病毒颗粒是否能够感染宿主细胞，因此并不能准确反映出病毒的感染性，通常用于研究病毒的结构和组成等方面。感染性滴度是指样本中具有感染性的病毒颗粒的数量[3]，可反映病毒的生物学活性和感染能力，因此在病毒疾病的诊断、治疗和疫苗开发中具有重要作用。通过准确区分样本中的感染性颗粒与非感染性颗粒，可有效反映病毒类产品的纯度、效力及安全性。国家药品审评中心2022年5月发布的《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则（试行）》中也强调，可通过计算病毒载体中感染性颗粒数与总颗粒数的比例，来比较不同批次产品之间和载体制备的不同阶段之间的质量特征。因此，在病毒类产品的生产和质量控制中，感染性滴度是不可或缺的关键质量属性。

根据检测原理的不同，感染性滴度的测量方法主要为三类：第一类是基于病毒感染细胞后产生的细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）进行检测的方法，如蚀斑法（plaque assay）和半数组织培养感染量（50% tissue culture infectious dose，$TCID_{50}$）等；第二类是基于病毒的蛋白或核酸特征进行检测的方法，如荧光灶（fluorescent focus assay，FFA）法和各类聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）法等；第三类是基于病毒颗粒本身或感染细胞群进行检测的方法，如流式细胞术（flow cytometry，FCM）、纳米流式细胞术（nano-flow cytometry，nFCM）等。不同的方法各有优缺点，因此根据具体情况选择合适的方法进行感染性滴度的测量是非常重要的。

1　基于 CPE 的检测方法

CPE是指细胞被病毒感染后发生的形态学和功能上的变化。这些变化包括细胞形态的改变、细胞色素的释放、细胞凋亡、细胞溶解等[3—4]。CPE是病毒感染细胞的结果，通过检测细胞形态、细胞存活率以及细胞功能，可判断病毒的感染能力和细胞的受损程度。因此，评估CPE在病毒研究、疫苗制备、药物筛选等领域具有重要意义。

在病毒感染滴度的测量中，CPE可作为一种指标来评估病毒的感染能力。根据不同病毒的特性和感染细胞的类型，可选择不同方法进行CPE的检测。其中，蚀斑法和$TCID_{50}$法较为常用。

1.1　蚀斑法

1952年，DULBECCO[5]首次将噬菌体的蚀斑试验引入病毒定量研究中。该方法随后逐步成为检测病毒感染性滴度的经典方法，如ChP 2020年版三部中将蚀斑法作为乙型脑炎减毒活疫苗、黄热减毒活疫苗和水痘减毒活疫苗三类传统减毒疫苗的质量控制检测方法。蚀斑试验适用于可导致细胞裂解和脱落的病毒的感染性滴度计算。蚀斑试验[6]中，需先在培养皿中使用系列稀释的病毒感染单层细胞，经过适当时间的培养后，向培养皿中加入适宜的覆盖物（如琼脂或羧甲纤维素等[7]），以限制后代病毒在细胞间的扩散。随着感染的发展，增殖的病毒颗粒会裂解细胞并形成蚀斑。理论上，一个具备感染和裂解细胞能力的病毒颗粒可形成一个蚀斑，记作一个蚀斑形成单位（plaque forming unit，PFU）。为便于后续观察，可使用中性红或结晶紫等染料对单层细胞进行染色，通过对蚀斑数量的计数便可计算出病毒的感染性滴度，结果以PFU/mL为单位表示。

蚀斑法具有操作简便、结果准确的特点，可客观评价病毒的感染性滴度，但耗时较长，根据病毒种类的不同，需要培养4～10 d才能判定结果。另外，蚀斑法的可重复性、准确性和灵敏性受到多种因素的影响。首先，细胞的种类、来源和培养状态会对蚀斑的产生造成一定程度的影响。不同的细胞

株对病毒的敏感性和病毒的复制效率可能存在差异。其次，病毒感染细胞的培养时间等条件对蚀斑的形成也有重要影响。此外，覆盖物的选择和不同染料的使用也可能对蚀斑的观察和计数产生影响；甚至不同人员操作的熟练度和计数的主观性也会对结果产生影响[8]。

综上所述，尽管蚀斑法作为一种经典的感染性滴度检测方法，被广泛用于传统减毒疫苗的质量控制，但该法的检测流程中影响因素较多，在实际应用中具有一定的局限性，且较长的检测周期也不利于生产企业在生产过程中快速、有效地对中间产品进行质量控制。

1.2 $TCID_{50}$ 法

$TCID_{50}$ 法是一种适用于不能或不易产生蚀斑，但能产生明显 CPE 的感染性滴度检测方法。与蚀斑法类似，$TCID_{50}$ 法仍需将经过梯度稀释的病毒接种到培养有敏感细胞的 96 孔板中，经过一段时间培养后，通过显微观察、免疫荧光法或酶联免疫吸附法[9]等手段检测各稀释度条件下产生 CPE 的孔数，然后利用统计学方法计算病毒的感染性滴度[3]。

使用 $TCID_{50}$ 法进行检测时仍需进行细胞培养，导致该法耗时较长且重复性一般。但结果计算时统计学方法的运用，使 $TCID_{50}$ 法的结果更具有预见性，并且可减少不同操作人员之间造成的相对误差[10]。$TCID_{50}$ 法应用广泛，除传统的减毒疫苗产品外，现已可用于腺病毒（adenovirus，Adv）[11]、腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）载体[12]、水疱性口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）载体[13]的感染性滴度检测。

2 基于病毒颗粒特征组分的检测方法

2.1 FFA 法

FFA 法是蚀斑试验的一种变体，原理是在病毒感染细胞后，利用荧光标记的抗体与相应的病毒特征抗原结合，形成荧光灶，再通过计数产生的荧光灶来计算病毒感染性滴度，并以每 1 mL 病灶形成单位（fluorescent focus unit，FFU）为单位表示。相比于传统的蚀斑法和 $TCID_{50}$ 法，FFA 法的应用范围更广，可用于检测不能形成空斑或不导致明显 CPE 现象的病毒，如甲肝病毒[14]等。FFA 法无需等待细胞死亡或出现明显 CPE，因此所需感染时间较短，通常在病毒感染细胞 1 ～ 2 d 内即可进行检测，因此相较于上述方法更快速。抗原 - 抗体的相互作用使得该法具有良好的特异性，但抗体试剂的加入，也使得 FFA 法的成本与操作难度均有所增加。

目前，FFA 法在活病毒疫苗产品[15—16]的检测中表现出了较高潜力。白萱等[16]验证了采用 FFA 法作为含有 G1、G2、G3、G4、G8、G9 型 VP7 基因的六价轮状病毒疫苗的感染性滴度检测方法的可行性。该法利用轮状病毒 VP7 蛋白抗体为一抗，荧光标记的抗体为二抗，通过间接统计梯度稀释的轮状病毒疫苗株感染 MA104 细胞 18 h 后形成的荧光灶，计算六价轮状病毒疫苗的感染性滴度。对荧光灶达 3 ～ 80 个的病毒稀释度孔进行计数，可计算出疫苗中各型病毒的感染性滴度。该法不仅因各型疫苗与对应抗体之间的特异性而具有良好的专属性，还同时具有良好的精密度、线性、准确性和耐用性。

2.2 PCR 法

为克服上述方法在耗时、重复性等方面的限制，迫切需要开发更快速、准确且可靠的病毒感染性滴度检测方法。分子生物技术的出现满足了生产单位对速度、质量的需求，因此越来越多的分子技术被用于病毒定量分析。

PCR 技术因快速、通用、灵敏的特点，已成为病毒定量检测的金标准之一。然而，常规的 PCR 方法只能定量分析病毒的全基因组，无法区分其中的感染性颗粒与非感染性颗粒，不适于检定病毒类产品的纯度和生物学活性。为解决这个问题，可利用实时荧光定量 PCR（real time quantitative PCR，qPCR）、逆转录荧光定量 PCR（reverse transcription quantitative PCR，RT-qPCR）和叠氮溴化丙锭（propidium monoazide，PMA）联合 qPCR（PMAq-PCR）等多种方法进行检测。qPCR 法可作为一种终点检测方法，与 $TCID_{50}$ 法相结合用于提高原有方法的重复性、准确性。RT-qPCR 法通过与细胞培养相结合，可用于定量分析 RNA 减毒活疫苗中的感染性病毒颗粒。此外，为了寻求更加快速、便捷

和高通量的检测手段，可以采用 PMAq-PCR 法，通过评估病毒颗粒的完整性来计算产品的感染性滴度。

2.2.1 qPCR 法

qPCR 法是一种能够在 PCR 反应过程中实时检测和定量 PCR 产物的技术。它结合了 PCR 技术和荧光探针等检测方法，具有高灵敏度、准确性和快速性。与传统的末端定量 PCR 不同，qPCR 可在 PCR 反应的指数阶段实时监测样品中目标的相对分子质量，并产生定量结果。将荧光探针或染料引入反应混合物中进行 qPCR 检测时，DNA 样本会经 PCR 反应进行扩增，同时，这些荧光探针或染料可与 PCR 产物结合，并在 PCR 反应的每个循环中发出特定的荧光信号。荧光信号的强度与 PCR 产物的数量成正比，因此可通过测定荧光信号的增幅来确定目标分子的起始数量。

在 qPCR 中，常用的荧光探针包括 TaqMan 探针和分子信标（molecular beacons）。这些探针被设计为可与目标序列特异性结合，并在 PCR 反应过程中发出荧光信号。使用荧光探针，可精确测量特定的目标序列，且不受杂质或非特异性扩增的影响。

qPCR 法与 $TCID_{50}$ 法相结合，可有效改善传统 $TCID_{50}$ 法存在的主观性强、变异系数较大的问题。传统的 $TCID_{50}$ 法需通过显微观察、免疫荧光或酶联免疫吸附等方式检测各稀释度下产生 CPE 的孔数，而 qPCR 技术的出现进一步提高了检测的准确性和可靠性。LOCK 等[11] 采用 $TCID_{50}$ 法结合 qPCR 的方式测量重组腺病毒的感染性滴度。该法在含有人胚肾细胞（HEK 293 细胞）的 96 孔板中接种经梯度稀释的重组腺病毒，在培养 72 h 后提取每孔的病毒基因组，然后利用 qPCR 法扩增病毒，再根据扩增的结果判定各个孔是否为阳性感染孔，分别记录阳性孔和阴性孔数量，最后利用 Spearman-Karber 公式计算病毒感染性滴度。该法可提高测定腺病毒载体感染性滴度的灵敏度。此外，试验过程中使用 96 孔板，使操作的便利性有所提升，也提供了该技术自动化的可能性，有利于生产企业快速对中间品进行质量控制。

2.2.2 RT-qPCR 法

RT-qPCR 法作为 PCR 法的延伸，是一种通过将病毒 RNA 逆转录为相应的 cDNA，再使用特定的引物和探针进行扩增和检测目标序列，实现实时定量 RNA 含量检测的方法。与传统 PCR 法类似，RT-qPCR 法同样具有快速、灵敏、可重复性好等优势。

RT-qPCR 法通过与细胞感染方法相结合，可用于 RNA 减毒活疫苗的感染性滴度检测[17—18]。该法通过使用已知感染性滴度的减毒活疫苗作为参考品，使用系列稀释的参考品感染细胞；感染一段时间后，收集细胞裂解物中的病毒进行 RT-qPCR 分析。以系列稀释参考品的滴度值为横坐标、RT-qPCR 法所得的循环阈值（cycle threshold，Ct）为纵坐标，绘制标准曲线。之后，将同样培养并处理得到的供试品的 Ct 数据代入回归方程中，即可计算出供试品的病毒滴度。该法建立在细胞感染的基础上，疫苗中的活病毒可以复制和扩增，而死病毒无法复制，因此最终的检测结果能客观反映病毒的感染性滴度。

基于上述原理，孟凡红等[17] 建立了基于 RT-qPCR 技术测定腮腺炎减毒活疫苗感染性滴度的方法。通过设计针对腮腺炎减毒活疫苗株 S79 血凝素基因保守区域的特异性引物和 TaqMan 荧光探针，可分析病毒感染非洲绿猴肾细胞（Vero 细胞）18 h 后获得的裂解物中病毒的感染性滴度。结果证明，其设计的特异性引物对腮腺炎减毒活疫苗的特异性良好，对灭活的腮腺炎减毒活疫苗、水痘病毒等均无特异性扩增。后续试验证明，该法具有良好的精密性、准确性，是一种有利于生产企业质量控制的快速检测手段。杜加亮等[18] 针对各型轮状病毒重配株的 VP7 基因中差异明显的片段，设计了特异性引物和探针，利用一步 RT-qPCR 技术对 MA104 细胞经疫苗感染 18 ～ 20 h 后的细胞裂解物进行分析，成功检测了五价轮状病毒减毒活疫苗的感染性滴度，并且证明该法与标准方法具有良好的相关性。

RT-qPCR 法与细胞感染方法的结合，为病毒感染性滴度的检测提供了更为简便、快速的方法，更有利于企业生产过程中的质量控制，也利于不同企业生产的相同品种病毒疫苗之间的比较研究。

2.2.3 PMA-qPCR 法

PMA 是一种具有高度核酸亲和性的光敏性活

性染料，能进入包膜或衣壳蛋白不完整的死病毒中，借助强可见光的作用与病毒核酸共价结合。在PCR检测过程中加入PMA，可干扰死病毒核酸的扩增，从而将包膜或衣壳蛋白完整的感染性病毒颗粒与缺损的非感染性病毒颗粒区分开来，消除死病毒对qPCR反应所得Ct值的影响[19—20]。研究[21]表明，在对死病毒进行qPCR检测时，PMA处理组与无PMA处理组之间的Ct值具有明显差异，而对感染性病毒进行同样处理时，Ct值差异则很小。应用PMA-qPCR法时，需要将适宜浓度的PMA染料与供试品在一定温度下共同孵育、光解。病毒与染料的结合效率会因其种类的不同而有所差异，因此预处理过程中的PMA浓度、作用温度、作用时间和光解时间也会有所区别。确定适用于不同种类病毒的最佳PMA预处理条件是PMA-qPCR技术应用研究的重点[22]。

PMA-qPCR技术现已成功运用于甲肝病毒[23]、腺病毒及轮状病毒[24]中感染性颗粒和非感染性颗粒的区分。HONG等[25]建立了一种基于PMA-RT-qPCR技术的方法，用于定量检测样本中感染性严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型（SARS-CoV-2）的含量，可在3 h内区分样本中的死、活病毒。结果显示，在对经过热灭活的SARS-CoV-2颗粒进行RT-qPCR检测后，PMA处理组与无PMA处理组之间的Ct值差异大于9，而对感染性SARS-CoV-2病毒颗粒进行同样处理时，两者之间的Ct值差异则小于0.5。

近年来，PMA-qPCR技术在病毒类疫苗的质量控制中得到应用。卞莲莲等[26]建立了一种PMA-RT-qPCR的方法，能快速、灵敏地量化甲型肝炎减毒疫苗的感染性滴度，并且与法定方法具有良好的相关性。这种方法能满足国内疫苗生产单位对甲型肝炎减毒疫苗病毒滴度检测的限度要求。PMA-qPCR在疫苗生产环节的初步探索，有助于生产单位对中间环节产品的质量进行控制，进一步缩短产品的生产周期。

3 基于病毒颗粒本身或感染细胞群进行检测的方法

3.1 FCM

FCM是一种能对溶液中单个细胞或颗粒进行多参数、快速定量和分选的技术[27]。FCM通过检测待测样本的单细胞悬液在激光器照射和激发下产生的光信号，可以获得样本中颗粒的粒径大小、复杂程度等信息。FCM主要产生2种光信号，即散射光信号和荧光信号。散射光信号分为前向散射光（forward scatter，FSC）和侧向散射光（side scatter，SSC）；FSC反映待测样本中颗粒的相对大小，而SSC反映待测样本的复杂程度。不同样本中颗粒的大小和复杂程度不同，通过比较FSC和SSC可以划定目标样本群的范围。此外，还可以使用标记有荧光染料的抗体对样本进行标记，根据荧光信号的有无来判断样本中是否存在目标抗原，并根据荧光信号的强弱来评估目标抗原的表达水平。

通过标记目的抗原的方法，FCM技术已在部分病毒及病毒载体的感染性滴度检测中得到应用，如人免疫缺陷病毒[28]、腺病毒[29—30]、杆状病毒[31]。目前常用的病毒标记方法主要包括使用荧光蛋白基因标记、使用病毒表面抗原的对应抗体标记、使用病毒基因组染料标记以及使用荧光亲脂性标记物标记包膜病毒[32—33]。付志浩等[34]使用FCM建立了一种检测传播缺陷型仙台病毒载体感染性滴度的方法。该法利用带有荧光基团FITC标记的二抗间接标记感染仙台病毒载体的细胞，通过分析具有不同感染复数（multiplicity of infection，MOI）条件的样品中被感染细胞的比例，以及基于泊松分布的数学模型计算仙台病毒的感染性滴度。与传统方法相比，该法客观性强且重复性更好，对于病毒载体类生物制品的测定具有积极影响。

LOGAN等[35]利用病毒感染细胞后粒度的变化建立了一种更快速、更高通量的方法，无需进行标记即可检测样品中病毒的感染性滴度。以重组单纯疱疹病毒和重组金丝雀痘病毒为例，证实了病毒复制可导致受感染细胞的粒度随感染时间的增加而增大，并发现感染时间与病毒复制周期之间存在相关性。通过数学模型可计算样本的感染性滴度，并且所得结果与蚀斑法具有良好的相关性（R^2=0.8）。

除了上述应用，FCM技术的应用范围也在逐步扩大，如用于病毒疫苗[36—37]和CRA-T制品[38]的

研发和质量控制。VLASAK 等[37]建立了一种全新的人巨细胞病毒（human cytomegalovirus，HCMV）疫苗制剂的流式细胞术分析方法，可以对感染性滴度、总抗原浓度和纯度等多种质量属性进行表征。HCMV 在感染过程中可产生感染性病毒颗粒、非感染性包膜颗粒和致密体等多种颗粒，其中感染性病毒颗粒仅占总病毒颗粒的一小部分。通过使用核酸染料 SYTO 41 和标记 HCMV 表面抗原 2 种方法，可以准确区分和定量分析感染性病毒颗粒，并监测 HCMV 表面关键抗原在不同病毒颗粒上的分布。FCM 在 HCMV 疫苗领域的初步探索推动了相应制剂的研发和生产，对研究其他复杂病毒制剂也具有一定的参考价值。

3.2　nFCM

nFCM 是一种高分辨、高通量的细胞分析技术，结合了传统流式细胞术和纳米技术，通过微流体系统实现对单个细胞的快速、准确分析[39]。与传统流式细胞术的检测原理类似，nFCM 技术对样品的分析也依赖于检测到的单颗粒的散射光信号和荧光信号，同时 nFCM 技术可满足纳米颗粒的单颗粒水平表征。

采用透膜荧光核酸染料对病毒颗粒进行标记，可检测出具有不同 SSC 和荧光信号特征的完整病毒颗粒、病毒空壳和游离的病毒核酸，实现对样品中病毒颗粒的完整性、浓度和纯度的准确、快速测定。该法已成功用于 T7 噬菌体、腺病毒载体、噬菌体鸡尾酒制剂和兽用疫苗等多种病毒生物制剂完整性的表征[40]。该法还可用于检测病毒疫苗生产纯化过程中病毒组分和纯度的变化，实现对疫苗生产过程的动态监测，对疫苗的上游工艺开发具有重要的指导意义。

以 T7 噬菌体为例[40]，利用透膜荧光核酸染料 SYTO 82 对病毒进行标记，以区分不同的颗粒。完整的病毒颗粒可同时表现出一定的 SSC 信号和荧光信号特征；空衣壳仅具有类似于完整颗粒的 SSC 信号，但不具有荧光信号；游离核酸可被荧光染料标记，经激发后产生对应的荧光信号，但由于游离核酸本身结构简单且体积较小，与完整病毒颗粒显示出的 SSC 信号具有差异。同时，利用已知浓度的荧光聚苯乙烯微球作为外部标准品，可确定病毒粒子各组分的浓度。经计算，T7 噬菌体的可靠计数可低至 2×10^5 VP/mL，且与蚀斑法具有良好的相关性（R^2=0.999）。

对完整病毒颗粒和病毒样颗粒进行区分是有效定量测定病毒滴度的前提。一个具有完整功能结构的病毒颗粒可近似认作为一个具有感染性的病毒颗粒，因此 nFCM 法测得的完整病毒颗粒浓度在一定程度上接近于蚀斑法测得的病毒感染性滴度，使 nFCM 技术有望成为在企业生产过程中替代蚀斑法的快速滴度定量技术。

4　总结

目前，国内外使用的各类方法各有优缺点（表 1）。传统的蚀斑法、$TCID_{50}$ 法只适用于能产生明显 CPE 的病毒，且耗时长、重复性低等缺点使其应用受限。此外，这些方法在应用过程中还受所选择的细胞系、培养条件等因素的影响，可能导致假阴性结果的出现[41]。FFA 法虽然进一步扩大了检测范围并缩短了检测时间，但仍是一种操作烦琐、主观性较强的检测方法。相比之下，引入分子生物技术，可快速、简便地检测病毒类生物制品的感染性滴度。其中，qPCR 法可与 $TCID_{50}$ 法结合，提高 $TCID_{50}$ 法的准确性、可重复性。RT-qPCR 法与细胞感染方法结合后相较于蚀斑法更快速，有利于生产企业对中间产品进行质量控制。PMA-qPCR 法省去了感染细胞的过程，具有作为生物制品生产过程中快速筛选手段的潜力。然而，PMA-qPCR 法的通用性较差，需要根据不同病毒种类对预处理阶段 PMA 浓度、孵育时间和孵育温度等因素进行优化。此外，流式细胞术、纳米流式细胞术这类新技术的出现也大幅提高了检测速度与灵敏度，并且与经典方法具有良好的相关性；不仅可作为一种病毒感染性滴度的检测方法，还可为疫苗或其他疗法的研发提供新思路，在生物制品领域的应用前景广阔，应用范围有望进一步扩大。纳米流式细胞术进一步拓展了在纳米颗粒（尤其是在粒径小于 100 nm 的病毒及纳米药物等）中的应用。

表 1 感染性滴度检测技术的比较

Tab.1 Comparisons of Various Infectious Titer Detection Methods

方法	检测对象	操作要求	耗时 /d	费用	客观性	重复性
蚀斑法	产生 CPE 的细胞	低	4 ～ 10	低	弱	一般
$TCID_{50}$ 法	产生 CPE 的细胞	低	4 ～ 10	低	弱	一般
FFA 法	病毒抗原	低	1 ～ 2	中	弱	一般
qPCR 法	病毒核酸	中	1	中	强	好
RT-qPCR 法	病毒核酸	中	<2	中	强	好
PMA-qPCR 法	病毒核酸	中	<1	中	强	好
流式细胞术	病毒抗原 + 核酸	高	2 ～ 3	高	一般	好
纳米流式细胞术	病毒抗原 + 核酸	高	2 ～ 3	高	一般	好

病毒类产品种类的不断丰富，对生产企业和监管机构确保产品安全性和有效性带来了挑战。感染性滴度作为病毒类产品的关键质量控制指标之一，在质量控制中起重要作用。传统的病毒感染性滴度测定方法通常需要耗费大量时间和资源，而新检测技术在检测速度、准确性、精密度和高通量等方面展现出强大的优势。这些新技术有助于改善病毒类产品的质量，同时提高了生产企业和监管机构对产品可靠性的评估能力。监管机构应不断更新和完善病毒感染性滴度的相关标准和指南，以助于统一解释不同检测方法的结果，提高方法在产品质量控制中的可比性和可靠性，确保病毒感染性滴度检测结果的一致性，进而提高病毒类产品质量的有效性和安全性。

参考文献：

[1] TRANSFIGURACION J, MANCEUR A P, PETIOT E, *et al*. Particle quantification of influenza viruses by high performance liquid chromatography [J]. *Vaccine*, 2015, **33**(1): 78-84.

[2] AKHTARIAN S, MIRI S, DOOSTMOHAMMADI A, *et al*. Nanopore sensors for viral particle quantification: current progress and future prospects [J]. *Bioengineered*, 2021, **12**(2): 9189-9215.

[3] FLINT J R, RACANIELLO V, RALL G F. Principles of virology [M]. America: American Society Microbiology, 2020: 36-65.

[4] ENDERS J F. Cytopathology of virus infections: particular reference to tissue culture studies [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1954, **8**: 473-502.

[5] DULBECCO R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, **38**(8): 747-752.

[6] MENDOZA E J, MANGUIAT K, WOOD H, *et al*. Two detailed plaque assay protocols for the quantification of infectious SARS-CoV-2 [J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2020, **57**(1): 105.

[7] BAER A, KEHN-HALL K. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems [J]. *J Visualized Exp*, 2014, (93): 52065.

[8] COOPER P D. The plaque assay of animal viruses [J]. *Adv Virus Res*, 1962, **8**(18): 319-378.

[9] LI J, HU D M, DING X X, *et al*. Enzyme-linked immunosorbent assay-format tissue culture infectious dose-50 test for titrating dengue virus [J]. *PloS One*, 2011, **6**(7): e22553.

[10] ROLDÃO A, OLIVEIRA R, CARRONDO M J T, *et al*. Error assessment in recombinant baculovirus titration: evaluation of different methods [J]. *J Virol Methods*, 2009, **159**(1): 69-80.

[11] LOCK M, KORN M, WILSON J, *et al*. Measuring the infectious titer of recombinant adenovirus using tissue culture infection dose 50 % ($TCID_{50}$) end-point dilution and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) [J]. *Cold Spr Harb Prot*, 2019, (8): 10.

[12] 王 聪, 李 秀, 牛 苗, 等. 基于 $TCID_{50}$ 检测 AAV9 载体制品感染性滴度的方法 [J]. 中国生物工程杂志, 2021, **41**(10): 28-32.

[13] HOCHDORFER D, BUSINGER R, HOTTER D, *et al*. Automated, label-free TCID50 assay to determine the infectious titer of virus-based therapeutics [J]. *J Virol Methods*, 2022, **299**: 114318.

[14] CROMEANS T, SOBSEY M D, FIELDS H A. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus [J]. *J Med Virol*, 1987, **22**(1): 45-56.

[15] ZADE J K, KULKARNI P S, DESAI S A, *et al*. Bovine rotavirus pentavalent vaccine development in India [J]. *Vaccine*, 2014, **32**(1): A124-A128.

[16] 白　萱, 姜志军, 何泗涛, 等. 测定六价轮状病毒疫苗各型病毒滴度的荧光灶试验的验证 [J]. 国际生物制品学杂志, 2018, **41**(3): 5.

[17] 孟凡红, 刘先超, 王　爽, 等. 腮腺炎减毒活疫苗感染性滴度荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, **27**(11): 1463-1467.

[18] 杜加亮, 刘悦越, 张　永, 等. 轮状病毒减毒活疫苗感染性滴度一步法 RT-qPCR 检测方法的建立 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, **41**(21): 2570-2574.

[19] NOCKER A, CHEUNG C Y, CAMPER A K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells [J]. *J Microbiol Methods*, 2006, **67**(2): 310-320.

[20] CAWTHORN D M, WITTHUHN R C. Selective PCR detection of viable Enterobacter sakazakii cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, **105**(4): 1178-1185.

[21] FITTIPALDI M, RODRIGUEZ N J P, CODONY F, *et al*. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR [J]. *J Virol Methods*, 2010, **168**(1/2): 228-232.

[22] 黄　鑫, 王　裴, 谢　茜, 等. 感染性病毒 PMA 联合 qPCR 定量检测 [J]. 中国公共卫生, 2016, **32**(7): 991-994.

[23] SÁNCHEZ G, ELIZAQUÍVEL P, AZNAR R. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR [J]. *Food Environ Virol*, 2012, **4**(1): 21-25.

[24] LEIFELS M, JURZIK L, WILHELM M, *et al*. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2015, **218**(8): 686-693.

[25] HONG W, XIONG J, NYARUABA R, *et al*. Rapid determination of infectious SARS-CoV-2 in PCR-positive samples by SDS-PMA assisted RT-qPCR [J]. *Sci Total Environ*, 2021, **797**: 149085.

[26] 卞莲莲, 王一平, 孙世洋, 等. 基于叠氮溴化丙锭 - 定量反转录 - 聚合酶链式反应的甲型肝炎疫苗病毒滴度快速检测方法 [J]. 中国病毒病杂志, 2020, **10**(6): 421-425.

[27] MCKINNON K M. Flow cytometry: an overview [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, **120**: 1-11.

[28] BONAR M M, TILTON J C. High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus (HIV-1) particles by flow virometry [J]. *Virology*, 2017, **505**: 80-90.

[29] ASADA A, HAYAKAWA H, YANASE N, *et al*. A flow cytometry-based method to determine the titer of adenoviruses expressing an extraneous gene [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, **41**(10): 1615-1619.

[30] WEAVER L S, KADAN M J. Evaluation of adenoviral vectors by flow cytometry [J]. *Methods*, 2000, **21**(3): 297-312.

[31] 徐　鹏, 张佑红, 杨　益, 等. 流式细胞术快速检测杆状病毒滴度 [J]. 武汉工程大学学报, 2010, **32**(1): 57-60.

[32] ZAMORA J L R, AGUILAR H C. Flow virometry as a tool to study viruses [J]. *Methods*, 2018, **134**: 87-97.

[33] LIPPÉ R. Flow virometry: a powerful tool to functionally characterize viruses [J]. *J Virol*, 2018, **92**(3): e01765.

[34] 付志浩, 王军志. 应用流式细胞术检测仙台病毒载体感染滴度 [J]. 中国新药杂志, 2021, **30**(20): 1850-1854.

[35] LOGAN M, MANALIL J, NOTTE C, *et al*. A flow cytometric granularity assay for the quantification of infectious virus [J]. *Vaccine*, 2019, **37**(47): 7090-7099.

[36] DE ROSA S C. Vaccine applications of flow cytometry [J]. *Methods*, 2012, **57**(3): 383-391.

[37] VLASAK J, HOANG V M, CHRISTANTI S, *et al*. Use of flow cytometry for characterization of human cytomegalovirus vaccine particles [J]. *Vaccine*, 2016, **34**(20): 2321-2328.

[38] DEMARET J, VARLET P, TRAUET J, *et al*. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry [J]. *Cytometry Part B*, 2021, **100**(2): 218-224.

[39] 吴丽娜, 薛乘风, 田　野, 等. 纳米流式检测技术的研发、应用及前景 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2021, **60**(2): 178-190.

[40] NIU Q, MA L, ZHU S, *et al*. Quantitative assessment of the physical virus titer and purity by ultrasensitive flow virometry [J]. *Angew Chem*, 2021, **133**(17): 9437-9442.

[41] BARONE P W, WIEBE M E, LEUNG J C, *et al*. Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(5): 563-572.