

病毒滴度测定的新兴及改良方法进展

杜丽萍, 徐明明*, 官艳东, 周沙沙, 张杰

北京义翘神州科技股份有限公司检测部, 北京 100176

摘要: 病毒滴度测定是生物制药行业重要的分析方法, 广泛应用于病毒类生物制品的开发和生产、病毒清除灭活工艺验证、外源病毒检测等领域, 以确保病毒类生物制剂的活性和有效性, 以及生物制品的病毒安全性。因此, 建立快速、简单且准确的病毒滴定检测方法尤为重要。总结了检测病毒滴度的传统方法、新兴以及改良方法的特点、原理及具体应用, 并比较了各自的优缺点。一些新兴方法, 如微滴式数字PCR、病毒定量毛细管电泳、化学发光 ISH-PNA 测定、激光力细胞学等改进了传统方法耗时耗力、重复性差、准确性低、结果主观性大的缺点, 达到了快速、灵敏、自动化程度高、精密度高、结果更加稳健且客观的优点, 但部分新方法仪器昂贵或者未广泛使用, 需要根据实验目的选择合适的病毒滴定方法。

关键词: 生物制药; 病毒清除/灭活验证; 病毒感染性; 病毒滴定

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0026

中图分类号: Q93-33 文献标志码: A

Advances in Emerging and Improved Methods for Detecting Viral Titers

DU Liping, XU Mingming*, GUAN Yandong, ZHOU Shasha, ZHANG Jie

Testing Department of Sino Biological Inc., Beijing 100176, China

Abstract: Virus titration is an important analytical method in the biopharmaceutical industry, which is widely used in the development and production of viral biological products, the validation of virus clearance and inactivation processes, and the detection of exogenous viruses to ensure the activity and effectiveness of viral biologics, as well as the viral safety of biological products. It is important to establish a fast, simple, and accurate method for the detection of virus titration. This article summarized the characteristics, principles and specific applications of the traditional, emerging and improved methods for detecting viral titer and compared their advantages and disadvantages. Some emerging methods, such as droplet digital PCR, viral quantitative capillary electrophoresis, in situ hybridization (ISH) assay with chemiluminescent detection, laser force cytology, etc., have improved the shortcomings of traditional methods such as time-consuming and labor-intensive, poor repeatability, low accuracy, and large subjectivity of results, and have achieved the advantages of rapidity, sensitivity, high degree of automation, high precision, and more robust and objective results. However, some new methods are expensive or not widely used, and it is necessary to select the appropriate virus titration method according to the experimental purpose.

Key words: biopharmaceutical; viral clearance/inactivation validation; viral infectivity; virus titration

病毒类生物制品包括病毒性疫苗、用于基因和肿瘤治疗的病毒类载体等, 通过病毒滴定来评估其研发和生产工艺的效果。种毒制备、半成品检测将病毒滴度作为病毒性疫苗生产过程中活性和有效性的佐证和参考依据。病毒感染滴度作为病毒载体类基因或肿瘤治疗产品的一项重要质控指标, 对产品的质量评价及临床剂量使用具有重

要意义。生物制品的风险评估是通过病毒清除/灭活工艺验证来降低病毒传播的风险, 该工艺需要人为加入指示病毒来评估其有效程度, 指示病毒的滴度是病毒清除灭活工艺验证试验中的关键指标之一。因此, 病毒滴定广泛应用于生物制品的制造、检验和安全性验证过程, 建立快速、准确、稳定的病毒滴定方法十分必要。滴度测定中使用

收稿日期: 2024-02-23; 接受日期: 2024-03-21

联系方式: 杜丽萍 E-mail: 15774608960@163.com; *通信作者 徐明明 E-mail: mingming_xu@sinobiological.cn

的检测类型取决于所研究的病毒类型^[1],大致分为4类:①确定感染性水平;②测量病毒蛋白的存在或功能;③检测病毒基因组中病毒或标记核酸的存在;④计数物理病毒颗粒^[2]。

传统的检测病毒滴度的方法包括空斑法(plaque forming units, PFU)^[3]、50%组织培养感染剂量法(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)^[4]以及荧光定量聚合酶链式反应法(realtime fluorescence quantitative PCR, qPCR)。PFU法和TCID₅₀滴定法具有耗时耗力的缺点,qPCR虽然快速灵敏,但不能确保仅对感染性病毒颗粒进行定量。因此,除以上常用传统方法外,一些较为准确、快速、可靠的病毒滴定方法层出不穷。本文主要对病毒滴定的传统方法、改良方法以及新兴方法的原理、研究进展、优缺点进行综述,以期对生物产品的质量与临床使用剂量提供参考。

1 病毒滴度测定的传统方法

多数病毒感染体外培养的细胞后,常引起细胞形态学改变,如细胞团缩、裂解和肿大等,这种改变称为病毒致变效应(cytopathic effect, CPE),这种效应很容易用肉眼看到,或者低倍显微镜即可观察。最小细胞病变或非细胞病变性病毒需要使用可见染色剂(如结晶紫)或特异性抗体免疫染色(免疫测定)进行检测。传统的病毒滴度检测方法包括:空斑法、50%组织培养感染剂量法和荧光定量PCR法。其中,PFU方法和TCID₅₀法适用于感染并产生致病变效应病毒的滴度测定,是病毒滴度测定的传统方法,属于“确定病毒感染性水平”这一类型。

1.1 空斑法

1917年,*Felix d'Herelle*发现噬菌体能够在细菌培养基上形成透明空斑^[5],因此首次建立了空斑法定量细菌病毒(噬菌体)。1952年,*Dulbecco*^[6]对噬菌体空斑法进行了改进,可用于定量动物病毒。随着哺乳动物细胞培养技术的发展,空斑法开始应用于细胞上。

空斑法(PFU)是基于含病毒样品的连续稀释以及观察在单层细胞中CPE出现的方法。PFU测量每单位体积形成空斑的病毒颗粒数量,并考虑病毒粒子的复制能力,是一种功能测量^[7],也是测定体外滴度经典可靠的方法^[6,8-9]。PFU依赖于病

毒颗粒进入细胞并在细胞内复制,导致细胞膜破裂,并允许病毒后代扩散到邻近细胞,这个过程会产生一个孤立的感染区域和没有活细胞的空斑,用结晶紫或其他染色方法进行染色后,可以将这些空斑可视化。该方法是将病毒连续稀释后感染细胞,使用琼脂培养基将病毒感染局限于固定区域,若干天后病毒感染造成的细胞病变形成空斑,单位为PFU·mL⁻¹(空斑形成单位),由此计算病毒滴度,以Lg PFU·mL⁻¹表示。*Trowbridge*^[10]开发并评估了一种简单直接的针对一种梅迪维斯纳病毒、两种进行性肺炎病毒株和两种维斯纳病毒株的空斑法测定。添加二乙氨基乙基葡聚糖可将最大斑块生长所需的时间从12天减少到10天,并能够增强斑块的对比度。1985年,*Harada*等^[11]报道了MT-4细胞在空斑形成测定中用于滴定具有生物活性的HIV病毒。*Kiernan*等^[12]研究发现不同细胞接种浓度对空斑产生的孵育时间有明显影响,在适宜细胞浓度接种下会形成良好的细胞单层,孵育第4天可在合胞体形成区域观察到病毒斑块,到第6天斑块直径约2 mm。此外,在探究X-MuLV病毒感染PG-4细胞的空斑检测实验中,将细胞在35℃条件下培养、感染和孵育,不仅产生更清晰的斑块,且滴度更高^[13]。

空斑法的优点在于该方法比较经典、常用,是病毒检测和病毒清除/灭活验证研究的黄金标准,但仍然存在一些缺点:①检测操作繁琐、费力、自动化程度差,并且根据病毒生长和繁殖速度需要几小时到几天;②未感染的细胞单层中可能存在空斑样缺陷,受到主观性的影响,重复性较差。

1.2 50%组织培养感染剂量法

50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀)是空斑法测定的统计衍生方法^[7],能够测定细胞培养物的半数组织(细胞)感染量。TCID₅₀法测定病毒滴度原理为:取出 x 体积病毒液感染组织或细胞,该 x 体积病毒液中有50%可能含有病毒,从而使组织发生感染。 x 的倒数即为病毒滴度,其单位为TCID₅₀·mL⁻¹。TCID₅₀法基于泊松分布的统计学原理,常用的计算方法有Red-Muench法或Karber法。就TCID₅₀法而言,通常是基于显微镜检测或细胞染色进行可视化。客观可视化通常基于细胞内病毒的免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)染色来计算滴度,并结合显微镜肉眼观察CPE,但ICC染色成本高且耗时。有研究比较了

显微镜下CPE观察、ICC染色和结晶紫染色3种方法,以确定2种CPE形成病毒(猪源甲型流感病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒)的滴度,其中结晶紫染色和ICC染色比肉眼观察CPE检测更准确。因此,结晶紫染色可作为一种更快、更经济的方法,用于TCID₅₀检测病毒滴度^[14]。该方法具有所需实验材料少、实际操作一次完成、计算结果方便可靠且准确等优点;而缺点在于不能准确测定出感染病毒颗粒数,并且每组需要多个复孔才能得到较为精确的值,相对来说较为耗时耗力。

1.3 荧光定量PCR法

荧光定量PCR法(qPCR)是将病毒DNA序列的一段特定区域进行数量级扩增,是一种极其灵敏的检测方法,广泛应用于病毒的定性定量分析。该方法具有快速、特异、灵敏、稳定等优点,但由于其检测目标是病毒核酸,该技术本身无法区分感染性和非感染性病毒。因此,检测结果中始终存在假阳性信号,这使得qPCR技术不能单独用于病毒清除/灭活验证研究^[15-16]。

该技术最重要的障碍是如何实现感染性和非感染性病毒的分离。Nuanalsuwan等^[17]使用核酸酶和蛋白酶K组合对样品预处理,用于消除因存在灭活病毒而产生的假阳性信号,称为ET-qPCR。从理论上讲,被破坏的病毒衣壳比完整衣壳更容易被蛋白酶K降解,因此蛋白酶K预处理可降解灭活病毒的衣壳并暴露病毒核酸。在核酸酶降解灭活病毒的核酸后,只有感染性病毒才能用qPCR检测到^[18]。在实际应用中,由于ET-qPCR的主要目标是受损的病毒衣壳,当病毒灭活机制涉及衣壳损伤时,如巴氏杀菌或暴露于游离氯、二氧化氯,此方法是适用的;而当这种方法应用于验证单线态氧灭活的病毒时,由于线态氧灭活的主要靶点是病毒核酸,仅对病毒衣壳造成轻微损伤,这使得蛋白酶K难以在此过程中发挥作用^[19]。EMA-qPCR或PMA-qPCR是使用单叠氮化乙啶(ethidium monoazide, EMA)或单叠氮化丙啶(propidium monoazide, PMA)预处理灭活的病毒,嵌入染料渗透灭活病毒受损的衣壳并与病毒核酸交联,然后抑制qPCR过程中灭活病毒核酸的扩增。因此,从理论上讲,此法可以避免灭活病毒产生的假阳性信号^[20]。但当病毒衣壳略有变化,EMA和PMA并不能穿透灭活的病毒衣壳。虽然通过与表面活性剂(Triton、月桂酰肌氨酸钠)共处理可以进一步

提高EMA-qPCR和PMA-qPCR的检测精度,但仍不能保证染料会渗透到所有被破坏的病毒衣壳中^[21]。

有研究报道了一种仅检测感染性病毒更可行的策略,需要在qPCR之前对病毒进行预处理。例如,ICC-qPCR利用宿主细胞作为分离感染性和非感染性病毒的有效工具,因为只有活病毒才能将其基因组注入宿主细胞用于扩增。病毒(含有已灭活病毒和感染性病毒)接种宿主细胞,然后经历感染阶段,允许所有感染性病毒注射其核酸进入宿主细胞。而非感染性病毒洗涤数次,可从细胞培养基中被吸除。随后,将细胞孵育合适时间并扩增细胞内病毒,降低定量下限并提高检测灵敏度。最后,提取细胞和病毒中的核酸,使用具有病毒特异性引物进行qPCR定量病毒灭活后感染性病毒量^[22-23]。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)滴度通常使用质粒DNA标准品进行qPCR测定,但有文献报道qPCR方法在不同实验室之间的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)可以达到70%以上^[24]。在过去的二十年中,研究者在改进qPCR标准品制备、样品处理和引物/探针设计等方面做出了很多努力^[25-27]。有研究报道了一种在qPCR操作前取消核酸提取步骤的方法。在96孔PCR板中同时使用不耐热的DNase和RNase消化无细胞培养物上清液样品,随后酶被热变性;然后将qPCR试剂与同一板其他孔中的标准品和对照一起添加到孔板中;最后对板进行qPCR检测,分析样品中逆转录病毒样颗粒RVLP的RNA表达水平。该方法具有良好的精密度和准确度,并且具有较宽的定量线性范围^[28]。此外,有研究通过改善qPCR相关步骤来优化其检测的精度和准确度。使用AAV参考物质而不是质粒DNA作为qPCR标准品,并且在标准品和样品制备中加入5%吐温-20来进行“无酶解”方法。该新方法已对不同处理的AAV进行了广泛测试,发现检测结果高度精确且数据稳健。因此,qPCR法被研究人员广泛采用,并进一步用于高通量应用^[29]。

2 病毒滴定的新兴或改良方法

近年来,随着生物技术的飞速发展以及病毒滴定领域的深入研究,病毒滴定的新兴或改良方法层出不穷,按照确定感染性水平、测量病毒蛋白

的存在或功能、检测病毒基因组中病毒或标记核酸的存在、计数物理病毒颗粒这四个层面,进行了病毒滴定方法总结,并分析了各种病毒滴定方法的可行性和局限性。

2.1 确定病毒感染性水平

2.1.1 荧光灶试验 荧光灶试验(fluorescence focus assay, FFA)基于特异性抗体与病毒抗原结合,能够检测、滴定病毒感染性,特别是对于使用经典结晶紫或中性红染色法无法形成空斑的病毒。荧光灶试验是病毒空斑实验的变体,它依赖于病毒在易感细胞内的感染和复制。然而,与空斑实验不同,FFA通过针对目标病毒的荧光标记抗体,来检测感染细胞表面或内部的病毒蛋白,通过显微镜观察定量病毒感染性。FFA也可以实行自动化,使用专门的软件分析捕获图像以识别荧光灶,消除实验人员在空斑计数中的偏差和错误。首次使用荧光抗体的方法报道是用于评估流感病毒和新城疫病毒的感染性^[30-31]。有研究利用相同的原理开发了定量、自动化和高通量的FFA来检测新城疫病毒,其准确度与传统空斑实验测定结果相似,但花费时间较短。因此,FFA是支持病毒清除/灭活验证工艺开发的理想测定方法,用于基于病毒感染性的批次放行和临床批次的稳定性监测^[32]。由于FFA依赖细胞内病毒蛋白的直接检测,因此与传统空斑实验相比,这种变化既提高了灵敏度,又缩短了孵育时间。此外,如果有合适的抗体对病毒抗原进行免疫染色,则无法形成空斑的非细胞毒性病毒也可通过FFA进行定量^[33]。然而,这些传统的滴度测定需要耗费大量人力和时间,且在手动计数过程中容易出现实验人员偏差,通常不适合高通量药物筛选。为了解决这些缺点,有研究使用自动化成像工作流程开发了半自动化、高通量FFA,降低了用户主观性,大大提高了测定通量和再现性,还可广泛应用于其他病毒^[34]。

2.1.2 免疫过氧化物酶单层细胞实验 免疫过氧化物酶单层细胞实验(immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)的基本原理是抗原-抗体特异性结合,需要在敏感的单层细胞上进行。有研究建立了检测无CPE的猪圆环病毒2型(porcine circovirus type 2, PCV2)的IPMA法,将已进行PCV2接毒的PK-15细胞培养成单层,使用PCV2单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗,发生抗原-抗体特

异性结合,实现可视化,在倒置显微镜下可观察到被病毒感染细胞的细胞浆内含有棕褐色的单个或成团的颗粒^[35]。另有研究通过优化IPMA法,测定了猪瘟病毒C株(swine fever virus strain C, CSFV)的病毒含量,该法具有良好的灵敏度、重复性和特异性等优点^[36]。测试结果可以用普通的光学显微镜观察和解释,实验所需的试剂和耗材成本低,特别适合在基层单位使用。但其存在缺点,即在确定结果时会受到个别主观因素的影响,因此需要对专业操作人员进行培训,并积累经验。此外,当病毒含量过低而无法产生特定的颜色反应时,样品的阳性检出率略低于聚合酶链反应和酶联免疫法^[37]。

2.2 测量病毒蛋白的存在或功能

2.2.1 酶联免疫法 酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)基于在固相表面、酶标记的抗原或抗体与样品特异性结合,并发生显色反应。有研究利用qPCR-ELISA法检测甲肝减毒活疫苗的病毒滴度,通过生物素标记的引物来扩增疫苗病毒基因产物,将该产物加入到带有特异性探针的微孔板中进行杂交,通过酶联显色读取吸光度值,确定病毒滴度。该方法不仅快速简单、特异高效,且准确度和敏感度与传统方法相似^[38]。通过ELISA法测定细胞培养物上清液中的p24浓度,同时通过TaqMan™ RT-PCR定量HIV-1 gag RNA表达量,并将二者进行比较,结果显示两种方法具有相似的HIV-1复制指数并趋于稳定。不同地是,ELISA可检测的p24浓度范围较窄,因此需要稀释样品,而TaqMan™ HIV-1 gag PCR则无需稀释样本即可进行验证^[39]。刘超等^[40]建立了基于p24蛋白的双抗体夹心ELISA法来检测慢病毒载体的滴度,并考察了该法的精密度、准确度、适用性、特异性等指标,优化和提升了慢病毒载体的滴度检测。吴妙灵等^[41]建立了一种TCID₅₀-ELISA法相结合的轮状病毒滴度检测方法,按照TCID₅₀法步骤感染MA-104细胞并培养7天,使用ELISA进行结果判定,得到了与空斑法相一致的结果。虽然ELISA法特异高效,但该实验需要准备与靶标特异性结合的一抗,灵活性较低。

2.2.2 病毒定量毛细管电泳 病毒定量毛细管电泳(viral quantitative capillary electrophoresis, Viral qCE)是以毛细管为分离通道,根据电荷/质量之比的差异,在一定条件下将完整病毒与杂质区分开

来的液相分离技术。有研究提出一种基于毛细管区带电泳并对完整病毒定量和表征的方法,能够区分完整和游离的病毒片段,成本较低且实验结果稳健。这种方法在具有溶瘤特性的牛痘病毒(vaccinia virus, VV)上进行了验证。病毒样品制备后,溶液中含有完整的VV、破碎的病毒和宿主细胞残留DNA。应用毛细管电泳可以分离完整的病毒颗粒和宿主残留DNA,并测定DNA杂质污染水平。将YOYO-1染入嵌入DNA中诱导荧光,对完整DNA和游离DNA进行激光检测。该病毒定量毛细管电泳能够定量 $10^6 \sim 10^{12}$ ivp·mL⁻¹范围内的溶瘤性牛痘病毒^[42]。Bettonville等^[43]通过毛细管区带电泳分析HPV-VLP并进行优化,能够在10 min内检测到HPV-VLP,该方法也成功应用于成品HPV疫苗中。目前,此方法已成功应用于病毒类疫苗的质量控制中,具有样品使用量小、分辨率高、操作简单等优点。

2.3 检测病毒基因组中病毒或标记核酸的存在

2.3.1 微滴式数字PCR

微滴式数字PCR(drop-let digital PCR, ddPCR)是一种新的PCR技术,具有卓越的准确度和精密度,并且无需标准曲线或特殊的样品制备,即可对目标基因实现绝对定量^[44]。其原理是在PCR扩增前,对样品进行稀释和微滴化处理,使得样品中仅含有0或者1个目的基因,经过PCR后,根据荧光值确定每个液滴中含有的目的基因核酸数值,进而完成绝对定量。然而,ddPCR有其自身的缺点,即ddPCR不能从96孔扩大到384孔,且每个孔必须单独读取,这限制了通量并延长了检测时间,花费也较大。

有研究将分子检测和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)联合使用对腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)进行表征和定量,结果表明ddPCR在稳定性和检测方差方面优于qPCR,这对于部分纯化过程中的样品尤为重要。通过TEM分析评估病毒结构、聚集体和杂质的存在,发现这些影响了qPCR和ddPCR观察到的病毒滴度的差异,并且可以通过样品制备来改变。这些结果可作为创建分析方法的指南,以提供AAV病毒载体的鉴定和纯度测量^[45]。在新型冠状病毒肺炎疫情期间,采用qPCR对新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)进行检测容易出现“假阴性”结果,研究者们总结了ddPCR在该病毒检测中的

应用前景,以期提高检测的准确性^[46]。这说明ddPCR在病毒滴度检测中具有灵敏度高、可绝对定量的优点。

2.3.2 产物增强逆转录酶实验

基于PCR的逆转录酶检测对逆转录病毒具有高度敏感性。这些检测目前用于证明疫苗中不存在逆转录病毒污染。在产物增强逆转录酶实验(product-enhanced reverse transcriptase assay, PERT)中,逆转录病毒样品中存在的逆转录酶将病毒RNA逆转录为DNA,并将产生的DNA定量用于估计病毒颗粒浓度。该方法检测的是所有具有复制能力的逆转录病毒或类似病毒,可用作药物的筛选测定、病毒载量定量、RT药物敏感性测试以及生物制品中病毒灭活的控制^[47-48]。有研究发表的TaqMan荧光5'-核酸酶产物增强逆转录酶(TM-PERT)检测,是在靶向X-MuLV基因组env高度保守的基因序列中设计引物和探针,从样品中提取逆转录病毒基因组RNA进行逆转录,随后通过TaqMan法进行定量,以此获得稳健的数据结果^[49]。有研究报道了一种单管荧光产品增强逆转录酶(single tube fluorescence-PERT, STF-PERT)测定法,对逆转录病毒检测高度敏感(<10个病毒粒子),提高了重复性和检测效率^[50]。在此基础上, Ma等^[51]用其他逆转录酶[小鼠白血病病毒(murine leukemia virus, MMLV)、人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus type-1, HIV-1)]评估该实验在准确定量不同逆转录病毒类型中的可行性,并提出了详细的方案,以建立广泛使用的测定方法。该法仅适用于逆转录病毒且具有高度敏感性,在实际应用中需根据检测的病毒类型进行选择。

2.3.3 化学发光ISH-PNA测定

化学发光ISH-PNA测定法(a peptide nucleic acid (PNA)-based in situ hybridization (ISH) assay with chemiluminescent detection, ISH-PNA)的特点是具有高分辨率,可在单细胞内提供病毒核酸的清晰定位,与传统比色ISH检测相比具有更高的灵敏度。化学发光检测的可检测性高、线性范围宽,可以准确作出病毒感染周期后感染细胞百分比的客观评估,且允许在单细胞水平上对病毒核酸进行定量分析。以B19细小病毒为例,将PNA设计为与B19基因组的中心区域(2296-2311个核苷酸)互补,并在N端用生物素标记核酸序列,以便杂交B19基因组和成熟的病毒转录本。该测定使用基于链霉亲和素连接

的碱性磷酸酶和化学发光二氧杂环丁烷磷酸衍生物底物检测的生物素标记的 PNA 探针。对发光信号进行量化,并使用连接到落射荧光显微镜的超灵敏氮冷 CCD 相机进行成像。该测定用于分析细胞培养物中细小病毒 B19 的感染过程,并量化感染后不同时间的病毒核酸量^[52]。还有研究发现可利用近红外荧光团与激光扫描相结合,定量最小细胞病变和非细胞病变病毒的测定方法。这种自动化方法绕过了手动读取数据,从而消除了人为读数的偏见和错误。此外,图像数据由 LI-COR 的 Odyssey 软件翻译成数字数据,直接使用 Spearman-kaerber 法计算病毒滴度^[1],方便快捷。

2.4 计数物理病毒颗粒

2.4.1 分光光度计法 在开发腺病毒生物药物时,一个关键的测试参数是病毒物质的浓度,通常以物理病毒颗粒 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 表示。就腺病毒而言,通常是使用 OD₂₆₀ 法以及由 Maizel 等^[53]开发的吸收系数来评估。使用分光光度计检测 260 nm 处吸光值是一种物理实验方法,可以检测全部病毒含量,但不能区分有感染力和无感染力的病毒,且只能检测纯化后病毒的 DNA 和蛋白浓度,然后根据 OD₂₆₀ 值计算出病毒颗粒的浓度。值得注意的是,不同测试者使用的 OD₂₆₀ 方法各不相同,导致结果不同,使得研究者对此法的精密度和准确性感到担忧^[54]。为此相关行业研究者们建立了腺病毒(5 型)参考材料(adenovirus reference material, ARM),以帮助其他人开发自己的腺病毒物理粒子效价方法^[55]。在建立 ARM 的过程中,关键是表征其在十二烷基硫酸钠变性条件下 260 nm 处的吸光值。Berkowitz^[56]在此基础上,通过分析性超速离心法(analytical ultracentrifugation, AUC)结合折射率检测,得到了良好的结果并且该法对所有类型腺病毒具有适用性。虽然腺病毒 OD₂₆₀ 方法可以在任何实验室简单地实施,但腺病毒浓度数据具有高度变异性,而 AUC 结合折射率检测是评估腺病毒浓度的一种非常可靠的方法。此外,该法还可以同时获得关于腺病毒样本的详细特征信息,包括空衣壳、聚集体和其他形式的腺病毒的水平^[57]。

2.4.2 流式细胞分选 流式细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)利用其能从数千个单细胞的快速分析中收集大量数据集的能

力,被作为测定感染性病毒滴度的方法^[7, 58-60]。传统的流式细胞仪使用光的散射或发射来区分大量群体中具有不同物理学和生物学特征的细胞。前向散射光(forward scatter, FSC)和侧向散射光(side scatter, SSC)分别给出细胞的相对大小和粒度。荧光蛋白发射的光可以被量化并用于检测单个细胞的特定生物学特征。流式细胞术已被用于利用感染细胞中编码荧光蛋白的基因表达^[61-63],使用荧光抗体偶联物标记病毒蛋白^[64]或改变细胞形态来量化感染性病毒。有研究分别使用病毒糖蛋白、病毒编码的荧光报告蛋白和诱导荧光报告细胞系的抗体标记来量化了 3 种不同种类病毒,即麻疹病毒、水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)和 HIV-1 滴度,此方法被报道为一种快速可靠的病毒滴定测试方法^[7]。此外,该方法还可用于鉴定和定量感染和转化细胞中的其他腺病毒蛋白^[65]。由于构建重组荧光蛋白细胞系耗时,而标记病毒蛋白的荧光抗体偶联物试剂不容易获得,有研究通过流式细胞术测量细胞粒度水平,该水平与感染病毒滴度的自然对数相关。因此,流式细胞术非荧光检测病毒感染是一种快速可靠的病毒滴度定量方法,其准确度与传统空斑实验相似^[66]。另一研究基于活细胞 SSC 建立了一种无标记、简单、快速的病毒滴定方法检测重组杆状病毒滴度,结果显示与传统空斑实验相比有更高的准确性和可重复性^[67]。

近期,纳米流式检测技术(nano-flow cytometry, nFCM)由我国研究团队自主研发出来,该技术通过对单个病毒颗粒的侧向散射光和病毒核酸标记荧光进行检测读数,可以准确、快速的定量复杂样品中病毒的纯度和浓度,检测直径小至 27 nm 的单个病毒。研究发现,与 qPCR 定量的病毒基因组滴度相比,nFCM 测量的物理病毒滴度与通过噬菌斑测定确定的感染单位一致,且大大缩短了检测时间,可广泛应用于包膜病毒和非包膜病毒等各类病毒的测定^[68]。

2.4.3 透射电子显微镜 TEM 是一种定量样品中逆转录病毒颗粒水平的方法。通常细胞培养上清液中的病毒浓度太低,无法直接观察到足够数量的病毒颗粒,需要对样品进行浓缩。将浓缩的样品与特定浓度的乳胶珠和阴性染色剂(如醋酸双氧铀)混合,并通过 TEM 进行检测^[69]。TEM 是检测逆转录病毒最可靠的技术,但其缺点是污染

的细胞衍生颗粒(如外泌体)在镜下与病毒相似^[70]。这与通过蔗糖密度梯度离心纯化的样品类似,因为外泌体具有与病毒相同的密度,可能发生共纯化^[71]。有研究建立了光镜-电镜联用技术,检测了贴壁培养细胞 HEK293 被表达 GFP 的人 5 型腺病毒感染的情况,其原理是先在光镜下找到目标感染细胞进行标记,并在电镜下观察该标记细胞,该方法易于获取目标细胞且具有靶向性,但病毒颗粒的精确定量难度较大^[72]。

2.4.4 激光力细胞学 激光力细胞学(laser force cytology, LFC)是微流体和光学力的组合,无需使用标记即可分析单个细胞^[73]。细胞膜、细胞质、细胞器和细胞核特征的细微变化表现为细胞通过激光光子压力区域时速度、大小、形状和方向的变化。细胞生物化学、形态学和变形性(细胞骨架变化)的差异,通常与病毒感染、癌症、脓毒症和其他

疾病相关,产生可检测的光力和变形率差异,这些生化和生物物理特性可以量化,以非标记的方式表征细胞^[74]。有研究使用 LFC 来确定 Vero 细胞中 VSV 的感染性^[73]。Radiance LFC 仪根据悬浮细胞的内在特性对其进行分析,同时拍摄每个细胞的高分辨率视频,使用光学力来影响细胞结构并转移动量。该仪器对细胞测量的数据与收集的细胞上清液病毒滴度间建立相关性,并与 TCID₅₀ 检测的滴度有一致性,可作为病毒感染性的指标,重要的是可将病毒滴定时间成本从 3 天缩短至 16 h。还有研究提出使用 LFC 数据进行感染性实验设计,适用于各种应用的测量,包括初始滴度测量(可替代 TCID₅₀)、实时过程中的感染性检测(例如,生物反应器实时监测病毒滴度)和病毒中和实验(可替代 PRNT)^[75]。

表 1 总结了新兴或改良的病毒滴度检测方法。

表 1 病毒滴度检测方法总结
Table 1 Summary of virus titration methods

方法分类	方法名称	时间成本	费用成本	使用仪器	适用病毒种类	优点	缺点	可操作性
病毒感染水平	PFU 法	天~周	*	肉眼或低倍显微镜	产生 CPE 的病毒	操作简单	重复性差,费时费力,自动化程度差,受主观影响性大,需要病毒在培养时有复制周期	操作简单,工作量大,需要有经验的检测人员
	TCID ₅₀ 法	天~周	*	普通显微镜	产生 CPE 的病毒	操作简单	耗时耗力,需要重复多次	操作简单,工作量大,需要有经验的检测人员
	荧光灶试验	天	**	荧光显微镜	需要特异性病毒抗体	重复性高、降低主观性	需要特异性病毒抗体	操作较简单,通过预实验确定特异性抗体使用浓度,熟练操作荧光显微镜
	IPMA 法	天	**	荧光显微镜	需要特异性病毒抗体	高灵敏度、重复性和特异性好	结果受个别主观因素影响,且病毒含量过低时无法产生特定的颜色反应,样品阳性检出率略低	操作简单,方法成熟,实验所需试剂和耗材成本低
病毒蛋白水平	ELISA	小时~天	**	酶标仪	广泛应用	省时	严格性低,测量的病毒元素不一定与病毒颗粒有关	操作较简单,通过预实验确定相关实验细节

续表

方法分类	方法名称	时间成本	费用成本	使用仪器	适用病毒种类	优点	缺点	可操作性
病毒核酸水平	病毒定量毛细管电泳	小时~天	**	毛细管	广泛应用	样品使用量小、分辨率高、操作简单	主要应用在病毒类疫苗的质 量控制,不是严格意义上的病毒滴定	操作简单
	qPCR	小时	*	qPCR 仪	广泛应用	快速、灵敏、稳定	不能确保仅对感染颗粒进行定量	操作简单,考验操作人员精细程度
	ddPCR	小时	**	微液滴数字 PCR 仪	广泛应用	准确度和精密度高,无需标准曲线或特殊的样品制备,可对目标基因实现绝对定量	通量限制,花费大	操作简单,但受通量限制,工作量较大
	产物增强逆转录酶测定	小时~天	**	qPCR 仪	主要应用于逆转录病毒,如异种鼠白血病病毒和 C 型 CHO 细胞颗粒中所含的 RT 活性	特异性、准确性、精密度高、稳定	仅适用于逆转录病毒类	操作简单
	化学发光 ISH-PNA 测定	分~小时	***	荧光显微镜+ CCD 相机	B19 细小病毒	高分辨率,可在单细胞内提供病毒核酸的清晰定位,准确作出病毒感染周期后感染细胞百分比的客观评估,在单细胞水平上对病毒核酸进行定量	前期耗材多,需要生物素标记的 PNA 探针,在其他病毒上是否可行有待验证	操作较简单,通过预实验确定特异性抗体使用浓度
病毒颗粒水平	OD ₂₆₀	分	*	分光光度计	纯化后病毒	快速、简单	不能区分有感染力和无感染力病毒,病毒需纯化	操作简单
	FACS	分~小时	***	流式细胞仪	病毒需有荧光标记或使用特异性病毒抗体染色	快速、可靠	仪器花费大,标记病毒蛋白的荧光抗体偶联物试剂不容易获得	熟练掌握流式细胞仪操作,通过预实验确定特异性病毒抗体使用浓度
	TEM	小时	****	电子显微镜	广泛应用	可靠、直观	有细胞衍生颗粒的污染(如外泌体),通量低,精确定量难度大	操作复杂,需熟练掌握负染色技术和电镜技术
	激光力细胞学	小时~天	****	Radiance LFC 仪	广泛应用	省时、操作简单	仪器昂贵	仪器不常见,对检测人员要求高

注: *表示成本极低; **表示成本较低; ***表示成本较高; ****表示成本极高。

3 展望

建立快速且准确的病毒滴定方法在生物制品的制造、检验和安全性验证过程中至关重要。本文主要综述了传统及新兴或改良的病毒滴度检测方法。传统方法包括空斑法和TCID₅₀法,但检测费时费力,且主观性影响较大。qPCR法虽较为快速,但不准确,不能确保仅对感染颗粒进行定量,改进后的qPCR法可根据目的需要选择合适的方法进行检测。此外,本文从病毒感染性水平、病毒蛋白水平、病毒核酸水平和病毒颗粒水平4个方面,总结了新兴或改良的病毒滴度检测方法(表1),并通过具体实例分析,总结了这些方法的优缺点及适用体系,为后续研究中选择合适的病毒滴度检测方法提供了一定的基础和参考。在实际生产应用中,通常采用的不是众多病毒滴定方法中最快或最灵敏的定量方法,而是根据成本和收益做出决定。新兴的方法通常应用于研究层面,但更成熟的技术更倾向于或被接受用于实际的生物制品制造、检验和安全性验证过程中。不可否认的是,通过综合新兴方法的优点可以预见快速方法的趋势,包括允许高通量、自动化、低成本、客观性、可重复性、高精密度和准确度以及广泛的适用性,这为未来开发更先进的病毒滴度检测技术提供了方向。

参 考 文 献

- [1] WELDON S K, MISCHNICK S L, URLACHER T M, *et al.* Quantitation of virus using laser-based scanning of near-infrared fluorophores replaces manual plate reading in a virus titration assay[J]. *J. Virol. Meth.*, 2010, 168(1-2): 57-62.
- [2] HEIDER S, METZNER C. Quantitative real-time single particle analysis of virions[J]. *Virology*, 2014, 462-463: 199-206.
- [3] DULBECCO R, VOGT M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses[J]. *J. Exp. Med.*, 1954, 99(2): 167-182.
- [4] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints[J]. *Am. J. Epidemiol.*, 1938, 27(3): 493-497.
- [5] D'HERELLE F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques[J]. *Cr. Acad. Sci. Paris*, 1917, 165(10): 373-375.
- [6] 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.
- [7] GRIGOROV B, RABILLOUD J, LAWRENCE P, *et al.* Rapid titration of measles and other viruses: optimization with determination of replication cycle length[J/OL]. *PLoS ONE*, 2011, 6(9): e24135[2024-04-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024135>.
- [8] ROWE W P, PUGH W E, HARTLEY J W. Plaque assay techniques for murine leukemia viruses[J]. *Virology*, 1970, 42(4): 1136-1139.
- [9] COOPER P D. The plaque assay of animal viruses[J]. *Adv. Virus Res.*, 1961, 8: 319-378.
- [10] TROWBRIDGE R S. Evaluation of a plaque assay for the mae-di-progressive pneumonia-visna viruses[J]. *Appl. Microbiol.*, 1974, 28(3): 366-373.
- [11] HARADA S, KOYANAGI Y, YAMAMOTO N. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay[J]. *Science*, 1985, 229(4713): 563-566.
- [12] KIERNAN R E, MCPHEE D A, DOHERTY R R. Quantitation of infectious human immunodeficiency virus using a modified plaque forming assay[J]. *J. Virol. Methods*, 1988, 22(2-3): 303-308.
- [13] SHI L, CHEN Q, NORLING L A, *et al.* Real time quantitative PCR as a method to evaluate xenotropic murine leukemia virus removal during pharmaceutical protein purification[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, 87(7): 884-896.
- [14] FRIAS-DE-DIEGO A, CRISCI E. Use of crystal violet to improve visual cytopathic effect-based reading for viral titration using TCID₅₀ assays[J/OL]. *J. Vis. Exp.*, 2022(180): e63063 [2024-04-11]. <https://doi.org/10.3791/63063>.
- [15] PECSON B M, ACKERMANN M, KOHN T. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45(6): 2257-2263.
- [16] RICHARDS G P. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods[J]. *J. Food Prot.*, 1999, 62(6): 691-697.
- [17] NUANUALSUWAN S, CLIVER D O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses[J]. *J. Virol. Meth.*, 2002, 104(2): 217-225.
- [18] PFAENDER S, BRINKMANN J, TODT D, *et al.* Mechanisms of methods for hepatitis C virus inactivation[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 81(5): 1616-1621.
- [19] PECSON B M, MARTIN L V, KOHN T. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(17): 5544-5554.
- [20] ZHANG Y, QU S, XU L. Progress in the study of virus detection methods: the possibility of alternative methods to validate virus inactivation[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, 116(8): 2095-2102.
- [21] 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. Envir. Heal.*, 2015, 218(8): 686-693.
- [22] GUO X, WANG S, ZHAO C L, *et al.* An integrated cell ab-

- sorption process and quantitative PCR assay for the detection of the infectious virus in water[J]. *Sci. Total Environ.*, 2018, 635: 964-971.
- [23] RYU H, CASHDOLLAR J L, FOUT G S, *et al.* Applicability of integrated cell culture quantitative PCR (ICC-qPCR) for the detection of infectious adenovirus type 2 in UV disinfection studies[J]. *J. Environ. Sci. Heal. Part A*, 2015, 50(8): 777-787.
- [24] LOCK M, MCGORRAY S, AURICCHIO A, *et al.* Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material[J]. *Hum. Gene Ther.*, 2010, 21(10): 1273-1285.
- [25] AI J, IBRAHEIM R, TAI P W L, *et al.* A scalable and accurate method for quantifying vector genomes of recombinant adeno-associated viruses in crude lysate[J]. *Hum. Gene Ther. Meth.*, 2017, 28(3): 139-147.
- [26] WERLING N J, SATKUNANATHAN S, THORPE R, *et al.* Systematic comparison and validation of quantitative real-time PCR methods for the quantitation of adeno-associated viral products[J]. *Hum. Gene Ther. Meth.*, 2015, 26(3): 82-92.
- [27] D'COSTA S, BLOUIN V, BROUCQUE F, *et al.* Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR[J/OL]. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2016, 5: 16019[2024-04-10]. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.19>.
- [28] HUSSAIN M, RAYFIELD W J, ROUSH D J. A direct RT qPCR method for quantification of retrovirus-like particles in biopharmaceutical production with CHO cells[J/OL]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, 189: 113472[2024-04-10]. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113472>.
- [29] WANG Y, MENON N, SHEN S, *et al.* A qPCR method for AAV genome titer with ddPCR-level of accuracy and precision[J]. *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.*, 2020, 19: 341-346.
- [30] DEIBEL R, HOTCHIN J E. Quantitative applications of fluorescent antibody technique to influenza-virus-infected cell cultures[J]. *Virology*, 1959, 8(3): 367-380.
- [31] WHELOCK E F, TAMM I. Enumeration of cell-infecting particles of Newcastle disease virus by the fluorescent antibody technique[J]. *J. Exp. Med.*, 1961, 113(2): 301-316.
- [32] RUSH B S, COUGHLIN M L, SANYAL G. *In vitro* infectivity of oncolytic Newcastle disease virus: correlation between plaque and fluorescent focus assays[J]. *J. Virol. Meth.*, 2018, 251: 69-74.
- [33] LIU L. *Fields virology*, 6th edition[J/OL]. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, 59(4): 613[2024-04-10]. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu346>.
- [34] LEE E M, TITUS S A, XU M, *et al.* High-throughput Zika viral titer assay for rapid screening of antiviral drugs[J]. *Assay Drug Dev. Technol.*, 2019, 17(3): 128-139.
- [35] 郭全海, 刘秀玲. 免疫过氧化物酶单层细胞试验检测猪圆环病毒2型方法的建立[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2012(11): 122-123+182.
- GUO Q H, LIU X L. Establishment of immunoperoxidase monolayer cell test for detection of porcine circovirus type 2[J]. *Heilongjiang Anim. Sci. Vet. Med.*, 2012(11): 122-123+182.
- [36] 李晶梅, 朱薇, 秦红刚, 等. IFA 和 IPMA 方法测定猪瘟疫化弱病毒含量[J]. *中国兽药杂志*, 2013, 47(10): 35-38.
- LI J M, ZHU W, QIN H G, *et al.* IFA and IPMA for HCLV titer detection[J]. *Chin. J. Vet. Drug*, 2013, 47(10): 35-38.
- [37] PAN J, ZENG M, ZHAO M, *et al.* Research progress on the detection methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2023, 14: 1097905[2024-04-10]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1097905>.
- [38] 钱汶, 陈悦青, 洪艳, 等. RT-PCR-ELISA 方法检测甲肝减毒活疫苗病毒滴度的初步研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(3): 261-264.
- QIAN W, CHEN Y Q, HONG Y, *et al.* Preliminary study on RT-PCR-ELISA method for virus titer testing of live attenuated hepatitis A vaccine[J]. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 2004, 18(3): 261-264.
- [39] KLEIN S A, KARSTEN S, RÜSTER B, *et al.* Comparison of TaqMan real-time PCR and p24 Elisa for quantification of *in vitro* HIV-1 replication[J]. *J. Virol. Meth.*, 2003, 107(2): 169-175.
- [40] 刘超, 张玉柯, 刘华. 慢病毒载体 p24 蛋白含量的 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. *生物技术进展*, 2023, 13(3): 457-464.
- LIU C, ZHANG Y K, LIU H. Establishment and application of ELISA assay for detection of p24 protein content of lentivirus vector[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2023, 13(3): 457-464.
- [41] 吴妙灵, 白植生. 细胞感染 ELISA 滴定法(TCIDEA 50)检测轮状病毒感染滴度及其中和抗体的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1991, 5(3): 326-331.
- WU M L, BAI Z S. Establishment of TCIDEA 50 method for titration of rotavirus infectivity and neutralizing antibodies[J]. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 1991, 5(3): 326-331.
- [42] MIRONOV G G, CHECHIK A V, OZER R, *et al.* Viral quantitative capillary electrophoresis for counting intact viruses[J]. *Anal. Chem.*, 2011, 83(13): 5431-5435.
- [43] BETTONVILLE V, NICOL J T, THELEN N, *et al.* Study of intact virus-like particles of human papillomavirus by capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2016, 37(4): 579-586.
- [44] 郑子繁, 柳方方, 刘卫晓, 等. 数字 PCR 技术在核酸标准物质研制中的应用[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(6): 579-584.
- ZHENG Z F, LIU F F, LIU W X, *et al.* Application of digital PCR technology in the development of nucleic acid reference materials[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2020, 10(6): 579-584.
- [45] DOBNIK D, KOGOVŠEK P, JAKOMIN T, *et al.* Accurate quantification and characterization of adeno-associated viral vectors[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 1570[2024-04-10]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01570>.
- [46] 胡思宏, 游国叶. 数字 PCR 在新型冠状病毒检测中的应用前景[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(6): 674-679.
- HU S H, YOU G Y. Application prospects of digital PCR in detection of SARS-CoV-2[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2020, 10(6): 674-679.
- [47] PYRA H, BÖNI J, SCHÜPBACH J. Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91(4): 1544-1548.
- [48] LOVATT A, BLACK J, GALBRAITH D, *et al.* High throughput detection of retrovirus-associated reverse transcriptase using an improved fluorescent product enhanced reverse tran-

- scriptase assay and its comparison to conventional detection methods[J]. J. Virol. Meth., 1999, 82(2): 185-200.
- [49] BRORSON K, XU Y, SWANN P G, *et al.* Evaluation of a quantitative product-enhanced reverse transcriptase assay to monitor retrovirus in mAb cell-culture[J]. Biologicals, 2002, 30(1): 15-26.
- [50] SEARS J F, KHAN A S. Single-tube fluorescent product-enhanced reverse transcriptase assay with Ampliwax (STF-PERT) for retrovirus quantitation[J]. J. Virol. Meth., 2003, 108(1): 139-142.
- [51] MA Y K, KHAN A S. Evaluation of different RT enzyme standards for quantitation of retroviruses using the single-tube fluorescent product-enhanced reverse transcriptase assay[J]. J. Virol. Meth., 2009, 157(2): 133-140.
- [52] BONVICINI F, MIRASOLI M, GALLINELLA G, *et al.* PNA-based probe for quantitative chemiluminescent *in situ* hybridisation imaging of cellular parvovirus B19 replication kinetics[J]. Analyst, 2007, 132(6): 519-523.
- [53] MAIZEL J V Jr, WHITE D O, SCHARFF M D. The polypeptides of adenovirus. I. evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12[J]. Virology, 1968, 36(1): 115-125.
- [54] SWEENEY J A, HENNESSEY J P. Evaluation of accuracy and precision of adenovirus absorptivity at 260 nm under conditions of complete DNA disruption[J]. Virology, 2002, 295(2): 284-288.
- [55] SIMEK S, BYRNES A, BAUER S. FDA perspectives on the use of the adenovirus reference material[J]. BioProc. J., 2002, 1(2): 40-42.
- [56] BERKOWITZ S A. Determining the concentration and the absorptivity factor at 260 nm in sodium dodecyl sulfate of the adenovirus reference material using analytical ultracentrifugation[J]. Anal. Biochem., 2008, 380(1): 152-154.
- [57] BERKOWITZ S A, PHILO J S. Monitoring the homogeneity of adenovirus preparations (a gene therapy delivery system) using analytical ultracentrifugation[J]. Anal. Biochem., 2007, 362(1): 16-37.
- [58] LI Z, LING L, LIU X, *et al.* A flow cytometry-based immunotitration assay for rapid and accurate titer determination of modified vaccinia Ankara virus vectors[J]. J. Virol. Meth., 2010, 169(1): 87-94.
- [59] LONSDALE R, PAU M G, OERLEMANS M, *et al.* A rapid method for immunotitration of influenza viruses using flow cytometry[J]. J. Virol. Meth., 2003, 110(1): 67-71.
- [60] MCSHARRY J J. Analysis of virus-infected cells by flow cytometry[J]. Methods, 2000, 21(3): 249-257.
- [61] KUNG S H, WANG Y C, LIN C H, *et al.* Rapid diagnosis and quantification of herpes simplex virus with a green fluorescent protein reporter system[J]. J. Virol. Meth., 2000, 90(2): 205-212.
- [62] FOSTER T P, RYBACHUK G V, KOUSOULAS K G. Expression of the enhanced green fluorescent protein by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) as an *in vitro* or *in vivo* marker for virus entry and replication[J]. J. Virol. Meth., 1998, 75(2): 151-160.
- [63] CTSAI Y, HTSAI T, CHANG C P, *et al.* Linear correlation between average fluorescence intensity of green fluorescent protein and the multiplicity of infection of recombinant adenovirus[J/OL]. J. Biomed. Sci., 2015, 22(1): 31[2024-04-10]. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0137-z>.
- [64] VENGATESAN D, RAJ G D, RAJA A, *et al.* Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry[J]. Clin. Cytom., 2006, 70(5): 335-343.
- [65] BOTTLEY G, HOLT J R, JAMES N J, *et al.* Flow cytometric detection of adenoviruses and intracellular adenovirus proteins[J]. Meth. Mol. Med., 2007, 130: 205-213.
- [66] 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.
- [67] QI J, LIU T, PAN J, *et al.* Rapid baculovirus titration assay based on viable cell side scatter (SSC)[J]. Anal. Chim. Acta, 2015, 879: 58-62.
- [68] NIU Q, MA L, ZHU S, *et al.* Quantitative assessment of the physical virus titer and purity by ultrasensitive flow virometry[J]. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2021, 60(17): 9351-9356.
- [69] ALAIN R. Quantitation of virus particles by negative stain electron microscopy[J]. Microscopy Today, 1997, 97: 20.
- [70] KWON Y J, HUNG G, ANDERSON W F, *et al.* Determination of infectious retrovirus concentration from colony-forming assay with quantitative analysis[J]. J. Virol., 2003, 77(10): 5712-5720.
- [71] GLUSCHANKOF P, MONDOR I, GELDERBLOM H R, *et al.* Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations[J]. Virology, 1997, 230(1): 125-133.
- [72] 冯红丽, 彭宇宁, 宋敬东. 一种用于贴壁培养细胞感染病毒检测的简易光镜-电镜联用技术[J]. 电子显微学报, 2023, 42(1): 86-93.
- FENG H L, PENG Y N, SONG J D. A simple correlative light and electron microscopy for virus detection in adherent culture cells[J]. J. Chin. Electron Microsc. Soc., 2023, 42(1): 86-93.
- [73] HEBERT C G, DINARDO N, EVANS Z L, *et al.* Rapid quantification of vesicular stomatitis virus in Vero cells using laser force cytology[J]. Vaccine, 2018, 36(41): 6061-6069.
- [74] HEBERT C G, HART S J, TERRAY A. Label free detection of pseudorabies virus infection in Vero cells using laser force analysis[J]. Analyst, 2014, 139(6): 1472-1481.
- [75] HEBERT C G, RODRIGUES K L, DINARDO N, *et al.* Viral infectivity quantification and neutralization assays using laser force cytology[J]. Meth. Mol. Biol., 2021, 2183: 575-585.