

## 以 EV71 抗原检测方法验证浅析生物制品生物效价检测方法学验证

刘正玲, 李娅娴\*, 赵勇, 杜宋婷, 王汉慧, 蒋曦, 贺凌煜, 袁明翠, 常亚军\*\*  
(北京协和医学院医学生物学研究所, 国家药品监督管理局疫苗及生物制品质量控制与评价重点实验室, 昆明 650503)

**摘要 目的:**本文以对生物制品生物效价检测进行规范的《中国药典》2020 年版新增 9401 指导原则为标准进行 EV71 抗原检测方法的验证, 进一步浅析生物制品生物活性/效价检测的方法学验证。**方法:**依据《中国药典》2020 年版 9401 指导原则, 结合 EV71 抗原检测方法特点及验证目的对其进行专属性、相对准确度、精密度、线性和范围 5 个方面进行方法学验证。**结果:**EV71 抗原检测方法专属性强, 6 个效价水平几何变异系数为 4.7% ~ 13.0%, 均小于 15%, 相对偏倚为 -6.05% ~ 9.03%, 均在  $\pm 15\%$  范围内, 定量范围为 225% ~ 31%, 线性回归相关系数为 0.999 5, 5 方面验证均符合要求, 且适用于该检测方法的使用。**结论:**本原则可具体指导生物学检测方法验证, 在对不同检测方法进行验证时, 根据检测目的、方法的原理、方法的技术特点、被检物的成分等设计具体方案。

**关键词:**中国药典 2020 年版; 生物制品; 生物活性/效价; 方法学验证; EV71 抗原检测

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2023)02-0000-00

doi: 10.19778/j.chp.2023.02.00?

## Validation of EV71 antigen detection method to analyze the method validation of biological titer detection of biological products

LIU Zhengling, LI Yaxian\*, ZHAO Yong, DU Songting, WANG Hanhui,  
JIANG Xi, HE Lingyu, YUAN Mingcui, CHANG Yajun\*\*

(Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, National Medicine products Administration Key Laboratory of Quality Control and Evaluation of Vaccines and Biological Products, Kunming 650503, China)

**Abstract Objective:** In this paper, the EV71 antigen detection method is verified based on the new 9401 guideline of the Chinese Pharmacopoeia 2020, which regulates the biological titer testing of biological products, and further analyzes the methodological validation of biological activity/potency testing of biological products. **Methods:** According to the 9401 guidelines of the Chinese Pharmacopoeia 2020, combined with the characteristics and verification purposes of the EV71 antigen detection method, methodological verification were carried out in five aspects: specificity, relative accuracy, precision, linearity and range. **Results:** The EV71 antigen detection method was highly specific, the geometric coefficient of variation of the six titer levels were 4.7% - 13.0%, all less than 15%, the relative bias were 6.05% - 9.03%, all within the range of  $\pm 15\%$ , and the quantitative range were

第一作者简介: 刘正玲, 硕士; 研究方向: 生物制品有效性成份检测。Tel: 0871-65957865; E-mail: liuzhengling@imbcams.com.cn

李娅娴, 工程师; 研究方向: 生物制品有效性成份检测。Tel: 0871-65957865; E-mail: liyaxian@imbcams.com.cn

\*\* 通讯作者简介: 常亚军, 助理研究员; 研究方向: 生物制品生产、质量保证。Tel: 0871-65957865; E-mail: ynchangyajun@imbcams.com.cn

cams.com.cn



225% - 31%, the linear regression correlation coefficient was 0.999 5, the verification in 5 aspects meets the requirements and were suitable for the use of this detection method. **Conclusion:** This principle can specifically guide the verification of biological detection methods. When verifying different detection methods, specific schemes should be designed according to the purpose of detection, the principle of the method, the technical characteristics of the method, and the composition of the tested substance.

**Key words:** Chinese Pharmacopoeia 2020; biological products; biological activity/potency; method validation; EV71 antigen detection

生物制品质量控制中生物活性/效价为反映生物制品有效性的关键质量属性,对相应的测定方法进行规范的验证是保障其适用性的前提<sup>[1]</sup>。分析方法验证是为了获得稳定、可靠的检验数据,保证数据的完整性,证明方法的可靠性,因此分析方法验证在检测过程中起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020年版修订之前生物学检测方法相关验证没有具体的指导原则,通常借鉴于药典的9101指导原则。基于生物学检测的复杂性及影响因素的未知性,部分9101的项目并不适用,《中国药典》2020年版新增了《9401生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则》,对相对效价检测方法验证设计及规范做了规定,可具体指导生物学检测方法验证,但在进行实际验证时需要考虑生物制品的特点。本文中以9401指导原则为基础进行肠道病毒71型(Enterovirus type 71, EV71)抗原检测方法验证,能够进一步探讨生物制品生物活性/效价检测方法验证中各验证指标定义、设计及验证过程。

## 1 材料和试剂

96孔单条可拆酶标板(美国 Corning Costar); PW-960全自动酶标洗板机(深圳汇松);酶标仪(BIOTEK synergy 2);BSA购自Solarbio;Tween20购自Amresco;底物液购自SIGMA公司;HRP标记的鼠抗兔IgG购自Thermo;抗体保护剂购自Candor公司;碳酸盐缓冲液为本室自配;PBS缓冲液为本所溶液室配制。羊抗EV71多克隆抗体及兔抗EV71多克隆抗体为本室制备;EV71收获液、原液、半成品及成品基质为自备。国家EV71抗原检测标准品(批号20100701,1600 U · mL<sup>-1</sup>)购自中国食品药品检定研究院。

## 2 EV71抗原检测方法验证

EV71抗原检测采用双抗体夹心酶联免疫法,通过双平行线法和国家EV71抗原检测标准品计算待检样品相对效价。操作流程如下:一抗包被羊抗EV71多克隆抗体,4℃孵育过夜洗板;加入1.5%

BSA室温封闭1.5h后洗板;加入待检样品及国家标准品,37℃孵育2h后洗板;加入兔抗EV71多克隆抗体,37℃孵育1h后洗板;加入HRP标记的鼠抗兔IgG,37℃孵育0.5h后洗板;TMB室温显色10min;1M硫酸终止反应,以450nm为检测波长,以630nm为校正波长读取OD值。

检测方法验证指标包括专属性、相对准确度、精密密度、线性和范围,后4个指标的验证进行合并设计。在EV71抗原检测方法这一定量检测体系来说主要针对准确度和回归分析。

### 2.1 专属性

**2.1.1 验证方法** EV71抗原检测采用ELISA检测方法,针对的样品纯度高杂质少、成分相对单一,使用时对方法的稳定性要求较高,验证中的专属性考虑基质、产品相关产物或非相关物质呈阴性即可。

**2.1.2 可接受标准** 各阶段产品基质或非相关物质均呈阴性反应。

**2.1.3 验证过程** 样品准备:准备一批EV71病毒收获液、原液、半成品(上样前需进行抗原解离)共3份阳性样品;抗原解离释放液、EV71病毒收获液基质、原液基质、半成品成品基质、KMB17细胞对照、CoxA16病毒(5.0 lgCCID<sub>50</sub>/mL)6份基质或非相关物质;EV71病毒收获液、原液、半成品反复冻融20次样品为降解产物。

上样:每个样品重复3孔,100 μL · 孔<sup>-1</sup>,同时设一孔空白孔,两孔阳性对照,三孔阴性对照。由同一实验人员重复3次,每孔A值 ≥ Cutoff值者为阳性,A值 < Cutoff值者为阴性。

**2.2 检测方法的相对准确度、中间精密性、线性和范围**

**2.2.1 验证方法** 相对准确度、中间精密性、线性和范围采取合并设计方法进行,对同一组数据进行不同分析并对相应验证指标进行评价。

相对准确度:采用不同效价水平相对偏倚的变化趋势来评价。

中间精密性:相对效价测定方法的中间精密密度

包含重复性考察,我们以中间精密度为标准进行验证,评价不同检测时间、不同操作人员、不同批次试剂检测的重复性。

**2.2.2 可接受标准 相对准确度:**参照 FDA《Bio-analytical Method Validation Guidance for Industry》<sup>[3]</sup> 建议配体结合分析中准确度在定量下限/上限为标示浓度的  $\pm 25\%$ ,其他为  $\pm 20\%$  的要求,根据更严格的抗原检测重复性的需求及预估标准,确定每个效价水平相对效价测定值的相对偏倚应在  $\pm 15\%$  范围内;因 6 个待测溶液在对数尺上呈均匀间隔,以效价理论值(横坐标)对其相应的效价测定值(纵坐标)做直线回归,回归方程斜率应在 1 附近,确定回归方程的斜率应在 0.8 ~ 1.25 范围内<sup>[1]</sup>。

**中间精密度:**国家药品评审中心 GPH1-1 文件中指出一般情况下酶法精密度要求小于 20%<sup>[5]</sup>,根据较好的抗原检测重复性的需求及预估标准,确定每个效价水平相对效价测定值的几何变异系数(GCV,%)应不大于 15%。

**线性:**以效价理论值(横坐标)对其相应的效价测定值(纵坐标)做直线回归。直线回归方程的相关系数应不低于 0.98,越接近于 1,两变量的线性关系越密切。

**范围:**从两方面考虑,一方面依据 ICH Q2 (R1)<sup>[6]</sup> 中对于成品含量最小测定范围 120% ~ 80%

的建议,一方面结合本检测体系应用,因目标样品通常为 3 000 ~ 175 U · mL<sup>-1</sup> 的区间值,预稀释后上样浓度为 150 ~ 44 U · mL<sup>-1</sup>,相对于标准品 80 U · mL<sup>-1</sup> 的相对效价为 188% ~ 55%,为了保证这一区间的检测准确性,该检测体系定量范围至少为相对效价上限的 120% 和下限的 80%,即为 225% ~ 44%。

**2.2.3 验证过程** <9401> 指导原则<sup>[1]</sup> 推荐评估 5 个效价水平,每个效价水平分别至少独立测定 3 次。此验证中取 EV71 抗原检测国家标准品进行稀释,稀释至 80 U · mL<sup>-1</sup> 作为标准品溶液,稀释至 180、120、80、55、35、25 U · mL<sup>-1</sup> 作为待测溶液,然后取标准品溶液和待测溶液在检测板上做 2 倍系列稀释,共 7 个稀释度,每个稀释度做 2 孔。即 6 个待测溶液相对于标准品 80 U · mL<sup>-1</sup> 的相对效价水平分别为 225%、150%、100%、69%、44%、31%,在对数尺度上呈均匀间隔。6 个效价水平均由两名检验人员在 3 个不同日期使用 2 个批号检测板进行检测,共独立检测 12 次。通过统计软件 SPSS 13.0 进行数据分析。

### 3 验证结果

#### 3.1 专属性验证结果

3 份阳性物质呈阳性,6 份基质或非相关物质呈阴性,见表 1。

表 1 专属性检测结果

Tab. 1 Specific test results

	3 次检测 OD 值(OD values of three times detection)		
	检测 3	检测 1	检测 2
EV71 病毒收获液(EV71 virus harvest)	1.844	1.750	1.823
EV71 原液(EV71 bulk)	1.900	2.402	2.231
EV71 半成品(EV71 semi-finished product)	1.245	1.171	1.255
抗原解离释放液(Antigen release liquid)	0.003	0.006	0.006
EV71 病毒收获液基质(EV71 virus harvest matrix)	0.019	0.023	0.029
EV71 原液基质(EV71 bulk matrix)	0.007	0.005	0.008
EV71 半成品基质(EV71 semi-finished product matrix)	0.024	0.035	0.031
KMB17 细胞对照(KMB17 cell control)	0.089	0.075	0.078
CoxA16 病毒收获液(CoxA16 virus harvest)	0.098	0.095	0.088
PBS 阴性对照(PBS negative control)	0.009	0.013	0.017
EV71 病毒收获液冻融 20 次样(The EV71 virus harvest was frozen and melted 20 times)	0.098	0.092	0.081
EV71 原液冻融 20 次样(EV71 bulk was frozen and melted 20 times)	0.034	0.043	0.048
EV71 半成品冻融 20 次样(EV71 semi-finished product was frozen and melted 20 times)	0.059	0.063	0.054

#### 3.2 EV71 抗原含量检测值

针对 6 个效价水平的抗原含量检测值,两名检

验人员在 3 个不同日期使用 2 个批号检测板进行的 12 次独立检测。酶联免疫反应检测值符合正态性

检验,可不进行数据转换。

**3.2.1 相对准确度验证结果** 相对准确度验证结果见表3:通过SPSS软件进行数据分析计算出各水平相对效价平均值、90%的上下置信区间,后通过相对效价检测值与理论值计算出相对偏倚。6个效价

水平相对偏倚为-6.05%~9.03%,均在±15%范围内,符合要求;以12次实测相对效价平均值为纵坐标,理论相对效价为横坐标进行直线回归分析,斜率为0.9125(见线性回归方程),位于0.8~1.25范围内,6个效价水平符合等距关系,符合预期要求。

**表2** EV71 抗原含量检测值( $U \cdot mL^{-1}$ )

**Tab.2** EV71 antigen content detection values

抗原含量 (antigen content) $U \cdot mL^{-1}$	相对标准品效价 (relative standard valence)/%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
225 $U \cdot mL^{-1}$	225	157	163	169	172	163	184	165	173	168	161	181	174
150 $U \cdot mL^{-1}$	150	118	115	114	104	112	125	112	122	111	108	115	108
100 $U \cdot mL^{-1}$	100	74	80	76	70	73	84	75	85	76	76	85	80
69 $U \cdot mL^{-1}$	69	58	60	53	55	54	65	54	57	57	55	62	59
44 $U \cdot mL^{-1}$	44	33	33	31	31	45	33	35	34	34	37	44	38
25 $U \cdot mL^{-1}$	31	24	22	26	26	23	30	27	30	28	29	28	31

**表3** EV71 抗原含量检测值相对效价(%)

**Tab.3** Relative titer of EV71 antigen content detection value

抗原含量 (antigen content)/ $U \cdot mL^{-1}$	相对效价理论值 (theoretical relative valence)/%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
225	225	196	204	211	215	204	230	206	216	210	201	226	217
150	150	148	144	143	130	140	156	140	153	139	135	144	135
100	100	93	100	95	88	91	105	94	106	95	95	106	100
69	69	73	75	66	69	68	81	68	71	71	69	77	74
44	44	41	41	39	39	56	41	44	43	43	46	55	48
25	31	30	28	33	33	29	38	34	38	35	36	35	39

**表4** 不同效价水平相对效价的相对偏倚及置信区间

**Tab.4** Relative bias and confidence intervals of relative potency at different potency levels

相对效价理论值 (theoretical relative valence)/%	相对效价检测值(relative valence detection value)				相对偏倚(relative bias)		
	平均值 (average value)/%	置信下限 (confidence lower limit)/%	置信上限 (confidence upper limit)/%	标准差 (standard deviation)/%	平均值 (average value)	置信下限 (confidence lower limit)	置信上限 (confidence upper limit)
225	211.4	205.0	218.0	10.0	-6.05	-8.89	-3.11
150	142.0	137.4	146.8	7.4	-5.33	-8.40	-2.13
100	97.3	93.4	101.2	6.2	-2.70	-6.60	1.20
69	71.8	68.9	74.6	4.5	4.06	-0.14	8.12
44	44.6	40.9	48.3	5.8	1.36	-7.05	9.77
31	33.8	31.5	36.0	3.6	9.03	1.61	16.13

**3.2.2 中间精密度验证结果** 6个效价水平几何变异系数数值为4.7%~13.0%,均小于15%,符合要求。且仅有44%、31%效价水平95%置信上限的几何变异系数高于15%。

**3.2.3 线性验证结果** 以效价理论值(横坐标)对其相应的效价测定值的对(纵坐标)做直线回归,见图1,相关系数为0.9995,不低于0.98,符合要求。

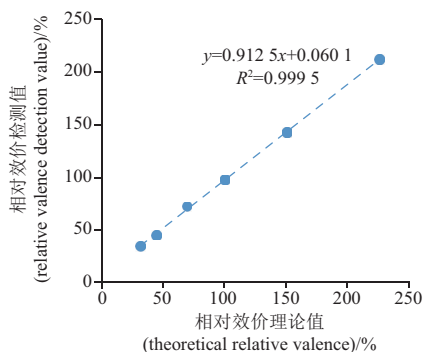


图1 相对效价检测值与理论值直线回归图

Fig. 1 Linear regression diagram of relative titer detection value and theoretical value

3.2.4 范围验证结果 6个效价水平几何变异系数为4.7%~13.0%，均小于15%，见表4；相对偏倚为-6.05%~9.03%范围内，均在±15%范围内，

表5 不同效价水平相对效价检测值的几何标准偏差、几何变异系数

Tab. 5 Geometric standard deviation and geometric coefficient of variation of relative titer detection values at different titer levels

相对效价水平 (relative valence levels)/%	试验次数 (test number)	几何标准偏差 (geometric standard deviation)	几何标准偏差置信上限 (confidence upper limit- geometric standard deviation)	几何变异系数 (geometric coefficient of variation)/%	几何变异系数置信上限 (confidence upper limit-geometric coefficient of variation)/%
225	12	1.047	1.074	4.7	7.4
150	12	1.054	1.086	5.4	8.6
100	12	1.064	1.101	6.4	10.1
69	12	1.064	1.101	6.4	10.1
44	12	1.130	1.208	13.0	20.8
31	12	1.117	1.187	11.7	18.7

#### 4.2 根据需求确定检验项目和验证指标

综合《中国药典》2020版<9101>和<9401>指导原则<sup>[1]</sup>，可总结出相应检测方法验证的检测项目，见表6，同药品评审中心生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则所述相同<sup>[5]</sup>。理化分析方法验证或杂质检测方法验证中对检测限和定量限有特定要求，而生物活性/效价检测以准确度精密度为主。<9401>指导原则<sup>[1]</sup>指出耐用性和重复性视情况而定。精密度为规定条件下同一份均匀供试品经多次取样测定所得结果之间的接近程度，包括重复性、中间精密度和重现性。ICH Q2(R1)<sup>[6]</sup>指出重复性是指在同样的操作条件下，在较短时间间隔的精密度，也称为间隙测量精密度；中间精密度是指试验室内条件改变，如不同日、不同分析者、不同仪器等情况下的精密度；重现性是指不同实验室之间的精密度（合作研究，通常用于方法学的标准化）。中间精密度已包含重复性检测不需单独验

见表3。说明相对效价225%~31%范围内相对准确度、精密度、线性都符合要求，在此范围内达到定量检测的要求，此范围宽于225%~44%范围要求，符合要求。

## 4 讨论

### 4.1 专属性

EV71 抗原检测方法的验证结合检测方法使用要求和范围，依据《中国药典》2020年版<9401>指导原则进行验证。针对样品成分相对单一的检测，专属性仅考虑基质、产品相关产物或非相关物质呈阴性即可，若样品成分较复杂或者有特定的可能干扰物质则需使用加标回收率试验进行验证，有研究者进行的人血浆丙氨酸氨基转移酶含量的方法学验证中即采用加标回收率进行专属性验证<sup>[4]</sup>。

证。若检测方法应用于临床或应用广泛，还应进行不同实验室间的重现性考察，自建EV71抗原含量检测仅应用于内部抗原含量检测，只需进行中间精密度验证。

### 4.3 各验证指标可接受范围分析

量检测的体外诊断试剂临床试验评价指标通常包括回归分析的回归系数、截距、相关系数等<sup>[7]</sup>，在生物效价/活性检测中也需要进行线性及范围的分析。ICH Q2(R1)<sup>[6]</sup>定义分析方法的范围是指样品中被分析物的较高浓度(量)和较低浓度(量)的一个区间，并已证实在此区间内，该方法具有合适的准确性、精密度和线性。分析方法的范围选择是验证的核心内容，只有根据检测方法应用范围的需求进行相对效价水平设定，才有进行准确度、精密度、线性的验证目标。EV71 抗原含量检测方法验证中结合应用要求，确定225%~44%的相对效价范围，最后确定包括这一范围的呈对数分布的6个相对效价水

平进行准确性、精密度和线性的验证。各个验证指标的可接受标准需根据具体检测进行设定,应根据测定方法特点和验证目的来灵活确定各验证指标的可接受标准。基于生物学检测的复杂性及检测用动物、细胞、组织等影响因素的未知性,检测结果相对于理化检测波动较大,一般规定准确度和精密度标准不高于

±20% 标准,定量上限/定量下限可定为不高于 ±25% 标准<sup>[3]</sup>,本文根据更为严格的应用需求,均确定标准为 ±15% ,EV71 抗原各效价水平除 44% 和 31% 效价水平验证指标置信上限位于 15% ~20% 之间,其他分析数据均为 ±15% 标准内,且验证指标以分析数据平均值进行评价,该验证指标满足要求。

表 6 检验项目和验证指标

Tab.6 Inspection items and validation indicators

指标 (indicators)	理化分析方法验证指标 (physical and chemical analysis validation indicators)				生物学测定方法验证 (bioassay validation)	
	鉴别 (Identity test)	杂质测定 (impurity detection)		含量测定-特性参数- 含量或效价测定 (content detection-characteristic parameters-content or potency determination)	生物制品生物 活性/效价检测 (biovalence detection of biological products)	
		定量 (Quantitative)	限度 (Limit)			
专属性(exclusivity) <sup>②</sup>	+	+	+	+	+	
准确度(accuracy)	-	+	-	+	+	
精密度(Precision)	重复性(repeatability)	-	+	-	+	- <sup>③</sup>
	中间精密度(intermediate precision)	-	+ <sup>①</sup>	-	+ <sup>①</sup>	+
	重现性(reproducibility)	/	/	/	/	- <sup>③</sup>
检测限(detection limit)	-	- <sup>③</sup>	+	-	-	
定量限(quantitative limit)	-	+	-	-	-	
线性(linearity)	-	+	-	+	+	
范围(range)	-	+	-	+	+	
耐用性(durability)	+	+	+	+	- <sup>③</sup>	

注:①已有重现性验证,不需验证中间精密度(Reproducibility has been verified, no intermediate precision verification is required);②如一种方法不够专属,可用其他方法予以补充(If one method is not specific enough, it can be supplemented by other methods);③视具体情况予以验证(Verify on a case-by-case basis)

4.4 小结

《中国药典》2020 年版《9401 生物制品生物活性/效价测定方法验证指导原则》可具体指导生物学检测方法验证,在对不同检测方法进行验证时,可根据检测目的、方法的原理、方法的技术特点、被检物的成分等设计具体方案。

参考文献

[1] 中国药典 2020 版. 四部 [S]. 2020:530  
ChP 2010. Vol IV [S]. 2020:530

[2] 宋伟. 基于 2020 版中国药典的分析方法验证指导原则解读 [J]. 山东化工, 2021, 50(13):95  
SONG W. Interpretation of the guiding principles of analytical method validation based on the Chinese pharmacopoeia 2020 Version [J]. Shandong Chem Ind, 2021, 50(13): 95

[3] U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Bioanalytical

Method Validation Guidance for Industry [S]. 2018:5

[4] 王月, 喻剑虹, 刘莹, 等. 双波长微孔板赖氏法检测人血浆丙氨酸氨基转移酶含量的方法学验证 [J]. 微生物学免疫学进展, 2020, 48(1): 69  
WANG Y, YU JH, LIU Y, et al. Validation of double wavelength microplate reitman-frankel assay in determination of ALT content in human plasma [J]. Prog Microbiol Immunol, 2020, 48(1): 69

[5] 国家药品评审中心. 生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则. GPH1-1 [S]. 2005:7  
Center for Drug Evaluation. General principles of quality control analytical methods for the validation of biological products. GPH1-1 [S]. 2005:7

[6] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2a [S]. 1994:1

[7] 国家药品监督管理局. 体外诊断试剂临床试验技术指导原则 [S]. 2021:14  
National Medical Products Administration. Technical guidelines for clinical trials of in vitro diagnostic reagents [S]. 2021:14

(收稿日期:2022-01-11)