

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.05.10

# WHO 国际生物制品标准物质制备指导原则介绍与我国兽用生物制品标准物质制备程序思考

李 翠,王 兆,万建青,徐 嫒,邹兴启,朱元源,徐 璐,  
张乾义,夏应菊,王 琴,郎洪武,赵启祖\*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2019-11-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 05-0072-06 [中图分类号] S851.66

**[摘 要]** 介绍了 WHO 2004 年公布的最新的国际及其他生物制品标准物质制备、鉴定和建立的指导原则,旨在引进科学的、具有指导性意义的国际生物制品标准物质建立程序和技术标准,为我国兽用生物制品标准物质制备程序的建立提供依据。

**[关键词]** 国际生物制品标准物质;指导原则

**基金项目:**“十二五”农村领域国家科技计划课题(2015BAD12B03-07);北京市科技计划课题(Z171100001317013)

**作者简介:**李 翠,副研究员,从事兽用生物制品标准物质研究。

**通讯作者:**赵启祖。E-mail:zhaqizu@163.com

[3] 高东旗,杨会锁,邓 冰,等.军用冷链保温箱的研制[J]. 医疗卫生装备, 2015,36(7):34-36.  
Yang D Q, Yang H S, Deng B, *et al.* Development of military cold-chain incubator [J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2015, 36(7):34-36.

[4] 世界卫生组织, WHO/PQS/ E004/CB01.2 疫苗冷藏箱[S].  
World Health Organization, WHO/PQS/ E004/CB01.2 Vaccine cold box[S].

[5] 中华人民共和国农业部. NT/Y 1623-2008 兽医运输冷藏箱[S].  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NT/Y 1623-2008 Transportation icebox for veterinary use [S].

[6] 中国国家标准化管理委员会. GB/T2423.2-2008 电工电子产品环境试验 第 2 部分:试验方法 试验 B:高温[S].  
China National Standardization Management Committee. GB/T2423.2-2008 Environmental testing for electric and electronic products—Part 2: Test methods—Test B: Dry heat [S].

[7] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 2423.1-2008 电工电子产品环境试验 第 2 部分:试验方法 试验 A:低温[S].  
China National Standardization Management Committee. GB/T2423.1-2008 Environmental testing for electric and electronic products—Part 2: Test methods—Test A: Cold [S].

[8] 世界卫生组织, WHO/PQS/E005/IP01.2 用做冰排、冷藏袋、暖袋的水排[S].  
World Health Organization, WHO/PQS/E005/IP01.2 Water-packs for use as ice-packs, cool-packs and warm-packs[S].

(编辑:陈 希)

# Introduction of WHO Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International Biological Reference Standards

LI Cui, WANG Zhao, WAN Jian - qing, XU Yuan, ZOU Xing - qi, ZHU Yuan - yuan, XU Lu, ZHANG Qian - yi, XIA Ying - ju, WANG Qin, LANG Hong - wu, ZHAO Qi - zu \*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to introduce scientific and guiding significance of the international biological reference standards for the establishment of procedures and technical standards, WHO recommendations for the preparation, characterization and establishment of international biological reference standards, issued in 2004, was introduced, which could provide the basis for the establishment of the procedure of the biological reference standards for veterinary in China.

**Key words:** international biological reference standards; guidelines

世界卫生组织(World Health Organization, 简称 WHO)的核心职能是发展、建立和推进食品、生物制品、药品及类似产品的国际标准化以及诊断程序的标准化。WHO 已经建立了用于预防、治疗和诊断人类疾病或异常情况相关的国际生物制品标准物质,以便于在世界范围内以相同形式表示此类生物制品的活性,为测量提供统一基础。

要保证各国或各区域生物制品标准物质的一致性,就必须建立相应的指导原则。1978 年,WHO 生物标准化专家委员会(Expert Committee on Biological Standardization, ECBS)首次制定了“关于生物制品标准物质制备和建立的指导原则”<sup>[1]</sup>。该指导原则旨在促进各国和各区域负责生物制品标准物质工作的相关机构进一步合作,为制备和建立生物制品标准物质提供技术指南。1986 年和 1990 年,ECBS 对指导原则进行了 2 次修订<sup>[2-3]</sup>,2004 年提出了最新修订版的指导原则<sup>[4]</sup>。下面对其进行详细介绍,以期为我国兽用生物制品标准物质制备程序的制定和相关标准物质的研制提供参考依据。

## 1 WHO 国际生物制品标准物质制备指导原则总述

WHO 国际生物制品标准物质由组分复杂的物质组成,需要以生物学或免疫学方法对其准确性。这些生物学或免疫学方法一般是相对的,而不是绝对的,所以标准物质在确定其生物学或免疫学

反应的定性和相对定量上起关键作用。

WHO 采用的生物标准化原则包括:标准物质的赋值是一个任意单位值而不是绝对单位值(但也有例外);标准物质的单位是以物理存在形式定义的;标准值的确定可以基于参考方法或多种方法;标准物质的性质应该与检测系统中被测样品的性质越相似越好。

生物制品具有不同类型的生物学活性,因此应分别建立作为生物学和免疫学标准的标准物质;给同一标准物质赋予不同类型的生物学活性;多数情况下,尤其是在体外诊断学领域,国际标准物质是被用于定性的而不是定量的,在这种情况下建立的标准物质可能并不被赋予国际单位,有时可能连活性赋值都没有,而是以某种适当的特性作为活性单位赋值。以前,未被赋予国际单位的标准物质被称为国际生物制品参考品,但这两种类别间并无明确界限。在此修订本中,取消了该说法。在对生物制品标准物质候选物作任何研究之前都必须清楚它是否作为定性检验用,因为这会影响研究的设计。必要时可能还需建立一组对照品来评价诊断试验。如 ECBS 建立了一组由 10 个不同基因型的 I 型人免疫缺陷性病毒(HIV - 1)组成的参考品组来评价 HIV - 1 的核酸扩增试验的特异性,该组参考品被确定为第一个 HIV - 1 基因型国际参考品组,而其

中的每个基因型并未被单独赋予单位量<sup>[5]</sup>。

正如 ISO 17511<sup>[6]</sup>标准中规定的,某种程度上,普通计量术语——不确定度已根据体外诊断领域的新规定逐渐被应用于生物制品标准物质,但国际生物制品标准物质被赋予任意国际单位值时,并未给出不确定度值。

## 2 国际生物制品标准物质的制备、鉴定和建立

WHO 用于建立标准物质的生物制品常由不同组分的物质混合而成,常存于复杂基质(如血清或血浆)中,而未被很好地鉴定。国际生物制品标准物质不需要很高的纯度。但当某一生物制品标准物质需要换批时,即使该制品的特殊活性已改变,也要尽量保证换批标准物质生物活性的国际单位具有连续性。国际生物制品标准物质的数量相对有限,主要被用于鉴定和校准地区、国家或其他二级标准物质,二级标准物质是常规使用的工作用标准物质。

指导原则对所用术语给出了定义,并对 WHO 标准物质进行了以下分类。标准物质是指在检测中具有校准作用的物质。国际生物制品标准物质是指为保证全球范围内生物学或免疫学测定结果的表示形式一致的标准物质,其活性值由 WHO 赋予国际单位 IU 值或其他适宜的单位。候选物的选择应满足所需目的,在第一次建立国际标准物质时,其活性单位值是在国际协作研究后人为决定的;在换批国际标准物质时,其活性单位值由上一批标准物质溯源而得。参考品是指其活性由 WHO 以某种单位而赋予的标准物质。该类标准物质是临时性的,在后来的建立期间,需积累获得足够的信息以使参考品被鉴定为国际标准物质。只有当参考品被最终确定为国际标准物质时,其效力才能以国际单位表示。经国际协作研究后,参考品的活性值被赋予国际单位,其值应与已赋予的单位值一致,若不同,必须有科学、合理的原因。建立参考品的特殊要求另有规定,明显不同于有关建立 WHO 国际生物制品标准物质的一般要求。国际参考品组是指由一组标准物质组成,共同辅助评价检测方法或诊断实验。

### 2.1 质量保证

2.1.1 质量管理体系 生物制品标准物质的获得、制备、贮存和分发应当在特定的质量管理体系下进行。国际上推荐的体系可以从 ISO 获得<sup>[7-8]</sup>。

2.1.2 报告 按照质量体系的要求,保存完整的记录是很重要的。另外,目标标准物质的制备背景和建议、负责人及其职责、原材料的检测证书、标准物质分装到容器前、中、后过程中进行的检测和试验(包括剩余水分和均匀性的质量控制试验)、稳定性试验、协作研究的原始数据、报告和建议、参与者赞成或反对意见的报告、贮存和分发等也是重要的。

2.1.3 方法确认 质量体系应当清楚地确定关键的设备和技术,并且制定出其功能确认和维护的程序。这些关键设备包括但不受限于冷冻或其他过渡点确定的分析设备、分装液体到安瓿或小瓶中的处理设备、冻干机、无菌填充隔离设备、安瓿或小瓶的密封设备、实施过程的控制设备、维持无菌/洁净间的空气过滤设备、灭菌/清洗和水纯化设备及保存设备等。

2.2 对建立国际生物制品标准物质的必要性进行评估 建立国际生物制品标准物质需要满足以下条件:在已批准或将要批准的生物制品的检验或定性中使用,并在多个国家分发;在医药或实验室检验中对生物制品的鉴定起重要作用;区域、国家或者实验室使用生物制品标准物质进行校准。

ECBS 通常不建立只用于科学研究的生物制品标准物质。但是,如果用于科学研究的生物制品标准物质是用于国际公共健康的,则可以制备。

当其他组织确定需要一种国际生物制品标准物质,就应当告知 WHO,并且告知 WHO 该组织是否愿意继续该标准物质的研究,以避免不必要的重复工作。同其他标准物质研制机构共同协作来建立标准物质是非常重要的。

2.3 原材料的本质、来源和保存 生物制品标准化的重要原则是在试验方法使用的检测体系中标准物质应当尽可能的接近试验样品。所以,候选物的选择应当反映检测方法中“相似性”的这一原则。

选择的原材料应当具有高度的稳定性和特异性,或者对于其采用的分析或试验方法来说具有充分的浓度含量。虽然原材料不需要具有最高的纯度,但也不应该存在其他成分干扰原材料所采用的检测方法。

原材料通常从单一来源获得,它可以是单一批次的部分或者全部。这对由人提供而获得的原材料来说是困难的,在这种情况下,大样本的一小部分对小样本的一大部分来说是首选的原材料。对于由工业加工制备的原材料,原材料的提供者应当提供批次分析证书。在未经提供者允许的条件下,这一信息不能透露给使用者。

如果要从多个批次或来源的原材料库来制备原材料,那么应当保证完全混合原材料,而且是均匀的。对于含有蛋白的液体原材料,在混合过程中应当考虑避免变性。另外,单一批次在混合前进行的任何研究都应说明可以做到均匀性混合。

为了适合作为国际标准物质,最终分装到容器中的原材料的量应该充分满足评估的需要,而且最好至少满足 10 年需要。在起草目标标准物质制备方案时,应当考虑制备换批标准物质所采用的方法。为了使单位的不连续性最小化,获得并拥有超额的候选原材料,则可用同样的材料替代;一旦可以保证稳定性,标准物质的延续性可以通过制备大批量来保证,如超过 20000 安瓿。需要分装的原材料的量将依赖于评估的需要,如果该材料仅被很少的实验室采用,那么很少的量就足够了。

原材料在分装到最终容器之前必须保存在适当条件下。建议最佳的储存条件应当从该批次原材料获得的制备者那里获得。在其保存在适宜条件前,从原材料中取出足够用于所有试验需要的样品。这些样品在用于试验前也应当被保存在同原材料相同的条件下。

如果干燥原材料不能使它们丧失生物学活性,而且复溶后它们能保持充分的活性并具有适当的物理特性,那么可以干燥形式保存。液体原材料通常应当冷冻保存,而且应当采取专门的措施保证获得适当的冷冻。如果液体原材料是无菌的或者含

有抗微生物的防腐剂,可以保存在 2 ~ 8 ℃。盛装原材料的容器应当能耐受冷冻、保存、融化、开封或必要时冻干等这样的条件,而且保存条件都应当保证保存材料的生物学活性。

2.4 最终生物制品标准物质的特性 应当测定容器中最终生物制品标准物质的剩余水分、残氧量、不含有微生物污染的证据及效力或生物学活性。

2.4.1 剩余水分测定 检测物质的量依赖于使用的检测方法以及批量大小。检测的量是通过预定取样方案来确定的。最广泛使用的方法是库氏(Coulometric Karl Fischer)滴定法。制剂的剩余水分含量少于 1% (W/W) 可表现长时间的稳定性。有些情况下更高的值如 5% 也是合适的。由于冻干物质都具有吸湿性,所以在检测过程中应当采取必要措施以避免吸收水分。

2.4.2 残氧量测定 检测物质的量依赖于使用的检测方法以及批量大小。检测的量是通过预定取样方案来确定的。测定时应至少采用 3 个容器,确认容器中的气体是惰性的,而且容器中的物质得到抗氧化性的保护。在大气压力下采用氧燃料电池计或质谱测定氧水平低于 45  $\mu\text{mol/L}$  时能充分保证长时间的稳定性。如果方法已经得到充分确认,那么不需要每批新的安瓿都进行残氧量测定。

2.4.3 特性及效力或生物活性 采用适当的方法证明容器中的生物制品保留其完整性、组分及效力或生物活性是非常重要的。

2.5 最终产品的稳定性 应在不同条件下通过确定标准物质效力或活性丧失的速度等方式进行稳定性监测,通常考虑以下三个原因:提供标准物质在确定的保存条件下适合于其目标用途的评估时间;确定标准物质分发到使用者的最佳条件;确定标准物质在重新溶解后保持其活性的持续时间。

由于标准物质是由其本身来确定活性单位的,几乎不能得到独立的衡量标准,因此在标准物质确定的保存条件下没有直接的方法评估其效力丧失的速度。丧失速度的测定是采用间接的近似方法进行的。这些方法一般以 Arrhenius 公式给定的反应速度和温度之间的关系为依据,且最初预定的

反应速度通常都是假设的。采用这些方法需要将标准物质样品保存在一系列升高的温度下,以预测保存在较低温度下的标准物质的相对效力。Kirkwood<sup>[12-14]</sup>根据最大相似方法描述了一个迭代程序来评估降解速度和温度间相关因素的参数。

热加速降解研究的数据也可以应用到在标准物质分发过程中预期更高温度下相似的活性丧失,而且也可以应用于确定分发的适宜条件。

重新溶解后物质稳定性的相关信息也应提供给使用者。有关影响重新溶解后物质的特性的其他信息,例如特殊类型容器的吸附性,也应当给出。由于重新溶解和保存条件不能在很多合作研究中广泛进行研究,所以此类信息是有限的。鼓励使用者将他们在常规实验室条件下使用标准物质进行的研究信息反馈给 WHO 或管理实验室。

用于生物制品标准物质稳定性监测的分析方法是否合适,取决于标准物质的本质和用途。稳定性研究需要的实验室数量一般少于评估候选物是否合适的协作标定的实验室数量。国际标准物质不指定有效期,而是根据存在的数据预测长期的稳定性。

**2.6 国际协作研究** 国际协作研究必须在 ECBS 考虑确定生物制品标准物质候选物之前进行,并且我们不可低估执行该研究的工作量及所需的资源。对于由 WHO 标准化实验室或其他 WHO 协作中心执行的标准化项目,WHO 必须通过 ECBS 了解协作实验室承担工作的意向,及是否认可建立候选物的原则,以避免不必要或重复性的工作。在建立国际标准物质工作原则上达成一致后,WHO 可以通过 ECBS 或者特殊项目的具有法律职责的工作组来对研究工作的大概提出一些建议。ECBS 不会涉足协作研究设计的细节问题。协作研究必须由一个或多个熟悉生物学领域的科学家组织,如有经验的生物统计学家<sup>[15]</sup>。具体要求详见《世界卫生组织国际生物制品标准物质协作研究技术要求》。

**2.7 需提供的详细资料** ECBS 要求提供与标准物质有关的详细资料,以判断该标准物质可否被接受为某一制品的国际生物制品标准物质候选物。

有关建立暂时性参考品需要提交的资料在《建立世界卫生组织国际生物制品标准物质需提交详细资料信息》中另有规定。

**2.8 国际生物制品标准物质的建立** 满足以下条件时,WHO 可能会建立某种国际生物制品标准物质;已准备好协作研究报告,所有的协作研究者都对该报告做出了评论,并且这些评论和报告已被提交给 ECBS;很好地解答了工作组或 WHO 邀请的其他同行评议后所提出的疑问;很好地解答生物制品检定顾问专家组成员在检查完所需提交的详细资料后所提出的疑问。基于所提交的详细资料和专家的建议材料,ECBS 做出统一决定,专家委员会的决议最终由 WHO 负责主管签署。

在 WHO 技术报告系列中列出了迄今为止 WHO 建立的所有国际生物制品标准物质,该系列报告及当前的最新版本可在 WHO 网站([www.who.int/biologicals](http://www.who.int/biologicals))查阅。已建立及被废弃的标准物质以附件的形式附于 ECBS 会议报告中。用户也可从标准物质管理实验室获得其纸质或电子版。

**2.9 国际生物制品标准物质的保存和发放** 管理实验室代表 WHO 保存和发放国际生物制品标准物质。上述的标准物质目录中给出了管理实验室负责哪些特殊标准物质的特性。管理实验室的关键职责是要有完备的应变计划来维护所保存物质的完整性<sup>[16]</sup>。WHO 鼓励标准物质管理实验室确定和维持足够数量的每一种国际标准物质的非现场保存,以防整个保存设备发生灾难性损坏或丢失时而需要进行的换批。在适当情况下,管理实验室要采取恰当的措施,以保证生物制品标准物质在运输时遵守传染性物质运输的国际规则。

### 3 我国兽用生物制品标准物质制备概况

生物制品标准物质在生物制品质量控制中起非常重要的作用。随着我国兽用生物制品事业的迅猛发展和兽用生物制品质量要求的不断提高,对兽用生物制品标准物质的要求也越来越高。近几年来,兽用生物制品标准物质的研制越来越受到国内科学工作者的重视,为提高其质量,也逐步与国际接轨,增加了协作标定、稳定性研究、均匀性检验

等检验参数。但目前国内对兽用生物制品标准物质的概念和分类还未统一,兽用生物制品标准物质制备和标定技术不统一,所以国内兽用生物制品标准物质的水平参差不齐。

#### 4 对建立我国兽用生物制品标准物质制备程序的建议

WHO 生物制品标准物质指导原则对国际生物制品标准物质的研制工作提供了技术指导,包括了生物制品标准物质的定义、质量控制、研制必要性、原材料选择、检验项目等,及时了解该指导原则,对建立我国兽用生物制品标准物质的制备程序具有重要意义。应根据 WHO 的要求,结合我国实际情况,明确兽用生物制品标准物质的概念和分类,确定研制标准物质的范围,统一制备程序,提高制备水平,逐步建立我国兽用生物制品标准物质指导原则,完善技术规范,从而进一步提高我国兽用生物制品标准物质的质量。

#### 参考文献:

[1] WHO Technical Report Series[R]. No. 626, 1978.  
[2] WHO Technical Report Series[R]. No. 760, 1987.  
[3] WHO Technical Report Series[R]. No. 800, 1990.  
[4] WHO Technical Report Series[R]. No. 932, 2006.  
[5] General requirements for the competence of reference material producers[S]. ISO Guide 34, 2000.  
[6] In vitro diagnostic devices – measurement of quantities in biological samples – metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials[S]. ISO 17511, 2004.  
[7] Kirkwood T B L. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards III. Principles of design [J]. Journal of Biological Standardization, 1984,

12; 215 – 224.

[8] Moss D W, Maire I, Calam D H, *et al.* Reference standards in clinical enzymology: preparation, requirements and practical interests[J]. Annales DE Biologie Clinique, 1994, 52: 189 – 198.  
[9] General requirements for the competence of reference material producers[S]. ISO Guide 34, 2000.  
[10] Campbell P J. International biological standards and reference preparations I. Preparation and presentation of materials to serve as standards and reference preparations[J]. Journal of Biological Standardization, 1974, 2; 249 – 258.  
[11] Campbell P J. International biological standards and reference preparations II. Procedures used for the production of biological standards and reference preparations [J]. Journal of Biological Standardization, 1974, 2; 259 – 267.  
[12] Kirkwood T B L. Predicting the stability of biological standards and products[J]. Biometrics, 1977, 33; 736 – 742.  
[13] Kirkwood T B L, Tydeman M S. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards II. A flexible computer program for data analysis [J]. Journal of Biological Standardization, 1984, 12; 207 – 214.  
[14] Kirkwood T B L. Design and analysis of accelerated degradation tests for the stability of biological standards III. Principles of design [J]. Journal of Biological Standardization, 1984, 12; 215 – 224.  
[15] Kirkwood T B L. Statistical aspects of the planning and analysis of collaborative studies on biological standards [J]. Journal of Biological Standardization, 1986, 14; 273 – 287.  
[16] Wood D J. Power shutdowns and biological standards [J]. Lancet, 2003, 362; 1939 – 1940.

(编辑:李文平)