

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.04

沙门氏菌类活疫苗活菌计数参考疫苗的研究

王秀丽¹, 张媛¹, 李红霞², 袁露², 李爱玲³, 曹翠萍³,
刘博¹, 辛凌翔¹, 彭国瑞¹, 李建¹, 蒋玉文^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 齐鲁动物保健品有限公司, 济南 250100; 3. 辽宁益康生物股份有限公司, 辽宁辽阳 111000)

[收稿日期] 2018-12-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0019-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为研制沙门氏菌类活疫苗活菌计数的参考疫苗, 以期更科学地评价活菌计数结果的有效性, 研究制备了一批仔猪副伤寒活疫苗作为参考疫苗候选物, 对其性状、纯粹检验、真空度、剩余水分进行检测, 对其运输稳定性、均一性进行测定, 组织协作标定对参考疫苗候选物进行赋值, 用协作标定的方法统计参考疫苗候选物在 18 个月的保存期, 将参考疫苗初步应用于仔猪副伤寒活疫苗活菌计数的检验。结果表明, 参考疫苗的性状、纯粹检验、剩余水分和真空度测定均符合《中国兽药典》的规定, 均一性试验结果显示 10 瓶参考疫苗候选物计数结果的变异系数小于 10%, 说明其均一性良好。协作标定统计出参考疫苗候选物的赋值范围为 $(3.0, 4.0) \times 10^9$ CFU/头份, 保存期试验结果显示参考疫苗候选物在 -70°C 以下保存 18 个月菌数稳定。参考疫苗的初步应用显示本参考疫苗不仅可以为沙门氏菌类活疫苗活菌计数提供参照物, 而且还可用于控制普通琼脂培养基的质量。

[关键词] 参考疫苗; 活菌计数; 沙门氏菌活疫苗

Study on Reference Vaccine for Bacterial Plate Count of *Salmonella* Vaccines

WANG Xiu-li¹, ZHANG Yuan¹, LI Hong-xia², YUAN Lu², LI Ai-ling³, CAO Cui-ping³,
LIU Bo¹, XIN Ling-xiang¹, PENG Guo-rui¹, LI Jian¹, JIANG Yu-wen^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Qilu Animal Health Products Co., Ltd, Jinan 250100, China;

3. Liaoning Yikang Biological Co., Ltd, Liaoyang, Liaoning 111000, China)

Corresponding author: JIANG Yu-wen, E-mail: 2312387082@qq.com

Abstract: A batch of paratyphus live vaccines for piglets was produced as the candidate for the bacterial plate count reference vaccine on salmonella vaccines, in order to evaluate the test result of the bacterial plate count more

基金项目: 国家重点研发计划“兽用生物制品及检测试剂质量评价标准研究”(2017YFF0208600)

作者简介: 王秀丽, 硕士, 从事细菌类生物制品的检验及检测技术研究。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail: 2312387082@qq.com

Liao Y H, Zhang X K, Sun J Z, *et al.* Isolation and identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain HN0613 [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(3):4-6.

experiments relating to artificial immunity in enzootic pneumonia of pigs[J]. Journal of Hygiene, 1969, 67(3):465-476.

[12] Goodwin R F W, Hodgson R G, Whittlestone P, *et al.* Some

(编辑:李文平)

scientifically. The parameters of characteristic, purity, vacuum degree, moisture were tested. The transport stability and uniformity were also tested. The live bacterium of candidates was statistical calculated by the value of collaboration calibration. The storage test in 18 months was carried out the same way as collaboration calibration. Then the candidates were used in the bacterial plate count test of paratyphus live vaccines for piglets. The study results showed that the candidates' characteristic, purity, vacuum degree, moisture were up to the specification of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The uniformity test results showed that the coefficient variation of the 10 samples was less than 10%, showing a good uniformity. The live bacterium of candidates were $(3.0, 4.0) \times 10^9$ CFU/dose. The storage test showed that the candidates were stable when they were stored at lower than -70°C for 18 months. The preliminary application showed that the reference vaccines can be used not only in the control of the quality of normal agar medium, but also in the control of the test process of bacterial plate count of *Salmonella* vaccines.

Key words: reference vaccines; bacterial plate count; *Salmonella* vaccine

沙门氏菌能感染多种动物,大部分沙门氏菌具有较强的致病性,成为肉类产品的主要污染源^[1]。二〇一五版《中国兽药典》中收录的沙门氏菌类活疫苗有仔猪副伤寒活疫苗(C500株)、沙门氏菌马流产活疫苗、牦牛副伤寒活疫苗、牛副伤寒灭活疫苗等^[2]。活菌计数是该类疫苗质量标准的重要参数,对于评价疫苗的安全性和免疫效力有重要意义;该类疫苗的效力检验(免疫攻毒法)也需要估计测毒及攻毒菌数。活菌计数受到多种因素影响,如培养基质量、培养条件、平板表面湿度、检验员的主观差异等,导致按照标准操作规程计数的结果不一致。在近几年的检验过程中,多次出现初次检验结果不符合规定,更换培养基或检验员重检后检验结果符合规定的情况,因目前没有活菌计数的参照物,对培养基的促生长能力及检验员的计数结果无科学评价的方法,重复检验降低工作效率,浪费实验材料。本研究试图研制沙门氏菌类疫苗活菌计数的参考疫苗,以期更加科学地评价沙门氏菌类疫苗活菌计数的结果。

1 材料与方法

1.1 参考疫苗候选物的制备及分发 按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》^[3]的方法,制备一批(500瓶)仔猪副伤寒活疫苗(20头份/瓶),作为参考疫苗候选物。按照现行《中国兽药典》三部对参考疫苗候选物的性状、纯粹检验、活菌计数、真空度测定、剩余水分等参数进行检验。从500瓶参考

疫苗候选物中随机抽取100瓶,置于隔热泡沫塑料盒内,并放入生物冰袋,最外层包装纸箱,快递至A单位、B单位和C单位,收到样品后立即置于 -70°C 以下冰箱中保存^[4]。

1.2 培养基及耗材 用6批原材料按《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版附录配制6批普通琼脂培养基,用上述培养基对随机抽取的3瓶参考疫苗候选物进行活菌计数,筛选出适宜的培养基原材料。用筛选出的原材料制备普通琼脂和普通肉汤培养基,用翻口胶塞密封后置于 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 保存。1 mL、10 mL一次性吸管购买自costar,一次性平皿(直径90 mm),购买自青岛金典生化器材公司。A、B、C三家单位所用的试验耗材完全一致。

1.3 均一性试验 随机抽取10瓶参考疫苗候选物,由2名检验员对10瓶参考疫苗候选物同时进行活菌计数,计算每位检验员对10瓶参考疫苗计数结果的变异系数,比较2组数据的差异程度。

1.4 协作标定 分别随机抽取100瓶参考疫苗候选物、100瓶普通琼脂(100 mL/瓶)、100瓶普通肉汤培养基(200 mL/瓶)以及相关耗材寄给B单位和C单位,A、B、C3家单位分别随机抽取2名检验员,每位检验员对3瓶参考疫苗候选物进行活菌计数,每瓶疫苗进行2次重复试验,统计不同检验员在不同时间、不同实验室活菌计数的结果^[5]。根据CNAS-GL02:2006《能力验证结果的统计处理和评价指南》^[6]中稳健统计方法,计算Z比分值,

剔除结果不满意的数据,计算活菌计数的几何平均数 $\bar{x} \pm 2s$ 作为参考疫苗候选物的菌数范围。

1.5 运输稳定性试验 B 单位和 C 单位分别从 100 瓶参考疫苗候选物中随机抽取 5 瓶用 1.1 项下的方式寄到 A 单位, A 单位收到样品后马上进行活菌计数,运输过程均需 2 d,分析运输过程对样品稳定性的影响。夏季(7 月份)和冬季(12 月份)分别试验一次。

1.6 加速破坏试验 随机抽取参考疫苗候选物,分别置于 2~8 °C、25 °C、37 °C、-20 °C 条件下,2~8 °C、25 °C、37 °C 条件下保存的样品每隔若干天随机抽取 3 瓶进行活菌计数,-20 °C 保存的样品每隔 6 个月随机抽取 3 瓶进行活菌计数,分析样品在不同储存条件下的稳定性^[7]。

1.7 保存期试验 将置于 -70 °C 以下保存的仔猪副伤寒参考疫苗候选物按 1.4 项下协作标定的方法每 1~2 个月取样并计数,至保存期 18 个月,对计数结果进行统计分析,每隔 6 个月对其性状、真空度、剩余水分测定一次。

1.8 参考疫苗的应用 2016-2018 年沙门氏菌类

活疫苗活菌计数的检验中,加入参考疫苗,每次检验随机抽取 3 瓶参考疫苗,其中至少 2 瓶参考疫苗计数结果在协作标定赋值范围内时对照成立,对待检疫苗进行结果判定。

2 结果

2.1 参考疫苗候选物的检验 参考疫苗候选物性状为海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解,随机抽取 5 瓶疫苗进行纯粹检验,结果 5/5 纯粹生长,真空度测定结果显示疫苗呈现白色或粉色或紫色辉光,随机抽取 4 瓶疫苗测定剩余水分,结果为 2.2%、2.3%、2.6%、2.1%,均小于 3.0%,活菌计数结果为 3.5×10^9 CFU/头份。

2.2 培养基的筛选 由 2 名检验员用编号 A~F 的 6 批普通琼脂培养基对相同的 3 瓶样品进行活菌计数。结果显示,6 批普通琼脂培养基计数结果无差异,2 名检验员计数结果基本一致(表 1)。因此,随机选 1 批培养基的原材料配制普通琼脂培养基 300 瓶,100 mL/瓶,配制普通肉汤培养基 400 瓶,100 mL/瓶,均用翻口胶塞封口后置于 2~8 °C 保存备用。

表 1 参考疫苗用 6 批普通琼脂培养基计数结果

Tab 1 Test result of the reference vaccines with 6 batches of normal agar mediums

检品编号	菌数/(10^9 CFU·头份 ⁻¹)					
	A	B	C	D	E	F
1	3.6/3.7	3.8/3.6	3.5/3.7	3.6/3.7	3.6/3.8	3.7/3.7
2	3.8/3.7	3.7/3.5	3.8/3.8	3.8/3.6	3.7/3.8	3.6/3.7
3	3.6/3.8	3.6/3.8	3.7/3.7	3.8/3.5	3.5/3.6	3.7/3.8

表格中的 2 个数据分别为两名检验员的检测结果

2.3 均一性试验 结果显示,2 名检验员对 10 瓶参考疫苗候选物计数结果的变异系数分别为 8.4% 和 8.2%,均小于 10%,说明均一性良好^[8],2 名检验员对同一瓶疫苗计数结果的差异小于 5.4%,说明检验员之间的计数结果差异不明显(表 2)。

2.4 协作标定 A、B、C 3 家单位 6 名检验员对 18 瓶参考疫苗候选物计数结果为($\times 10^9$ CFU):3.0、3.2、3.2、3.3、3.7、3.8、3.4、3.6、3.6、3.4、3.7、3.8、3.4、3.4、3.8、3.6、3.7、3.5、3.2、3.3、3.4、3.6、3.7、3.6、3.4、

3.2、3.6、3.5、4.2、3.9、4.2、4.0、3.5、3.2、3.3、3.3,用稳健统计法分析,剔除不满意数据($|Z| > 2$ 的数据)^[8]。34/36 结果满意,2/36 结果不满意,对 34 个结果进行统计, $\bar{x} \pm 2s$ 为 $(3.0, 4.0) \times 10^9$ CFU,定为该批次参考疫苗候选物计数结果的赋值范围。

2.5 运输稳定性试验 第一次运输稳定性试验(夏季,7 月份):B 单位和 C 单位寄回的 5 瓶参考疫苗候选物计数结果的最小值均为 3.7×10^9 CFU/头份,第二次运输稳定性试验(冬季,12 月

份);B 单位和 C 单位寄回的 5 瓶参考疫苗候选物计数结果的最小值分别为 3.6×10^9 CFU/头份, 3.7×10^9 CFU/头份。本参考疫苗候选物保存期 0 个

月时计数结果为 3.5×10^9 CFU/头份,运输后计数结果与其一致,说明该参考疫苗候选物在 48 h 内的运输稳定性良好(表 3)。

表 2 均一性试验结果

Tab 2 The uniformity test result

样品编号	检验员 1		检验员 2		满意度
	菌数/(10^9 CFU·头份 $^{-1}$)	Z 比分	菌数/(10^9 CFU·头份 $^{-1}$)	Z 比分	
1	4.4	0.77	4.2	0.675	满意/满意
2	3.6	-0.8	3.6	-0.87	满意/满意
3	3.6	-0.8	3.6	-0.87	满意/满意
4	4.2	0.39	4.3	0.289	满意/满意
5	3.4	-1.2	3.4	-1.25	满意/满意
6	3.8	-0.4	4.0	-0.48	满意/满意
7	3.8	-0.4	4.0	-0.48	满意/满意
8	4.3	0.58	4.4	0.482	满意/满意
9	4.2	0.39	4.3	0.289	满意/满意
10	4.2	0.39	4.1	0.289	满意/满意

表 3 运输稳定性试验结果

Tab 3 The transport stability test result

样品来源	检品编号	夏季		冬季	
		检验员 1	检验员 2	检验员 1	检验员 2
A 单位	1	3.9	4.0	3.8	3.7
	2	4.0	4.2	3.6	3.6
	3	3.7	3.6	3.6	3.8
	4	4.0	3.9	4.0	3.9
	5	3.7	3.8	3.7	3.8
B 单位	6	3.8	3.8	3.7	3.8
	7	4.1	4.0	3.8	4.0
	8	3.8	3.8	4.2	4.0
	9	4.3	4.1	4.0	3.7
	10	3.7	3.8	3.8	3.8

表中数据为测定的菌数,单位为 10^9 CFU/头份

2.6 加速破坏试验 加速破坏试验结果(表 4-表 7)显示:2~8 ℃ 保存 10 d,结果稳定,保存 20 d 菌数下降 17%;25 ℃ 保存 7 d,结果稳定,保存 20 d,菌数下降 22%;37 ℃ 保存 5 d,结果稳定,保存 7 d,菌数下降 31%;-20 ℃ 保存的疫苗 18 个月内菌数无下降,结果稳定。

2.7 保存期试验 按协作标定的方法对-70 ℃ 以下保存 18 个月以内的参考疫苗候选物逐月进行活

菌计数,剔除结果不满意的偏离数据,变异系数为 6.7%~8.9%,均小于 10%,平均数为 3.4×10^9 ~ 3.7×10^9 CFU/头份,中位数为 3.4×10^9 ~ 3.75×10^9 CFU/头份,均在活菌计数可接受的误差范围内,且计数结果在 18 个月内未随保存时间的延长而降低,保存期为 6 个月、12 个月、18 个月时分别随机抽取参考疫苗候选物检查性状、真空度,结果均符合《中国兽药典》的规定^[9],剩余水分均小于 3%。

表 4 参考疫苗候选物加速破坏试验 (2~8℃)

Tab 4 The accelerated damage test of the candidate reference vaccines (2~8℃)

保存时间/d	菌数/(10 ⁹ CFU·头份 ⁻¹)		
	1	2	3
1	3.5	4.2	4.2
2	3.6	3.6	3.4
3	3.4	3.9	3.7
4	3.6	4.3	4.0
7	3.9	3.7	3.5
10	3.6	4.0	4.2
20	2.9	3.2	/

表 5 参考疫苗候选物加速稳定性试验 (25℃)

Tab 5 The accelerated damage test of the candidate reference vaccines (25℃)

保存时间/d	菌数/(10 ⁹ CFU·头份 ⁻¹)		
	1	2	3
1	3.2	3.4	3.7
3	3.5	3.2	3.7
7	3.8	3.3	3.2
9	3.5	3.0	2.9
11	2.7	3.1	3.1
20	2.7	2.9	/

表 6 参考疫苗候选物加速稳定性试验 (37℃)

Tab 6 The accelerated damage test of the candidate reference vaccines (37℃)

保存时间/d	菌数/(10 ⁹ CFU·头份 ⁻¹)		
	1	2	3
1	3.2	3.5	3.7
3	3.3	3.2	3.4
5	3.2	3.3	3.4
7	2.2	2.5	2.3
11	0.9	0.6	

表 7 参考疫苗候选物加速稳定性试验 (-20℃)

Tab 7 The accelerated damage test of the candidate reference vaccines (-20℃)

保存时间/月	菌数/(10 ⁹ CFU·头份 ⁻¹)		
	1	2	3
6	3.5	3.7	3.7
12	4.0	3.7	3.4
18	3.5	3.3	3.6

2.8 参考疫苗的应用 本参考疫苗在应用过程中主要存在 4 种情况:(1)参考疫苗对照成立,待检疫苗不符合规定,这种情况下更换培养基,由 2 名检验员同时对待检疫苗进行重检,检测结果均与初次检验结果一致。(2)待检疫苗和参考疫苗结果均不符合规定,更换培养基对待检疫苗和参考疫苗重检测,参考疫苗结果符合规定,对待检疫苗进行判定。(3)参考疫苗符合规定,待检疫苗不符合规定,但二者在 37℃ 培养 24 h 菌落大小不一,继续延长培养时间仍有新菌落长出,且菌落直径总体小于本菌在 37℃ 培养 24 h 的大小。(4)待检疫苗和参考疫苗均符合各自质量标准(表 8)。

3 结论与讨论

在生物制品的检验中增加参考品以更加客观、

科学的评价检验结果是未来的一种趋势,国外以及国内人用生物制品参考品的研究及应用越来越广泛^[10-11]。活菌计数是细菌类活疫苗质量控制最重要的参数之一,直接关系到疫苗的安全性和免疫效力,参考疫苗的研究对于客观评价疫苗的菌数有极其重要的意义。目前我国尚无任何活菌计数的参考疫苗,也无控制培养基促生长能力的参考疫苗,对影响活菌计数结果的关键因素之一培养基的质量无法科学评价,外加其他因素的影响,更无法科学评价活菌计数结果的有效性。活菌计数的参照物在美国细菌类疫苗如多杀性巴氏杆菌和猪丹毒杆菌活疫苗的检验中已应用多年^[12-13],但其应用和判定不适合中国国情。

通过对沙门氏菌类活菌计数参考疫苗的系统研究,制定出参考疫苗的质量标准:性状、纯粹检验、真空度测定、剩余水分测定的标准参照《中国兽药典》;活菌计数标准为随机抽取 3 瓶参考疫苗,至少有 2 瓶计数结果在参考疫苗协作标定赋值范围内,且在 37℃ 培养 24 h,菌落大小均匀一致;均一

表 8 参考疫苗的应用情况

Tab 8 The preliminary application of the reference vaccine

编号	待检疫苗菌数 /(10 ⁹ CFU·头份 ⁻¹)			参考疫苗菌数 /(10 ⁹ CFU·头份 ⁻¹)			判断
1	2.9	3.2	2.7	3.8	4.0	4.2	编号 1~3 为参考疫苗对照成立,待检疫苗不符合质量标准的规定,判定待检疫苗不合格
2	3.0	2.5	2.8	3.7	3.5	4.2	
3	2.8	2.8	2.7	3.5	3.8	4.3	
4	2.7	2.5	1.9	3.7	3.4	4.4	编号 4 为某次复核检验,初次检验参考疫苗计数结果符合规定,待检疫苗不符合规定,但菌落大小不一,且小于该菌 37℃ 培养 24 小时的大小,延长培养时间仍有新菌落长出,提示培养基质量存在问题;编号 5 为更换培养基后重检结果,参考疫苗和待检疫苗均符合各自标准。
5	4.1	4.5	5.1	3.8	3.9	4.2	
6	1.9	2.0	1.7	2.1	2.5	2.2	编号 6 为初次检验,参考疫苗和待检疫苗均不符合规定,编号 7 为更换培养基后检验结果均符合规定。
7	3.2	3.3	3.0	3.4	3.2	3.7	
8	3.2	3.5	3.3	3.5	3.2	3.8	待检疫苗和参考疫苗均符合各自质量标准

性检验标准为随机抽取 10 瓶参考疫苗进行活菌计数,10 瓶参考疫苗计数结果的变异系数小于 10.0%;运输稳定性标准为将参考疫苗置于 2~15℃ 运输不超过 48 h,活菌数下降应小于 10.0%。

参考疫苗换批时需对现有的在保存期内的参考疫苗用普通琼脂进行计数,如果计数结果符合参考疫苗的质量标准,说明普通琼脂培养基的灵敏度适宜,用该普通琼脂培养基对新制备的参考疫苗进行检验和协作标定,以确保参考疫苗在换批时标准一致^[14]。

参考疫苗的应用结果显示,本参考疫苗既可以应用于控制沙门氏菌类活疫苗活菌计数的过程,又可以用于控制普通琼脂培养基的质量。控制沙门氏菌类活疫苗活菌计数的过程时,每次检验均需使用参考疫苗对试验结果的有效性进行判定。若一次检验中使用同一批普通琼脂培养基对多批次样品进行检验,则仅需要使用 3 瓶参考疫苗对试验结果的有效性进行判定。若一次检验中使用了不同批次的普通琼脂培养基,则每批次普通琼脂培养基均需用 3 瓶参考疫苗对试验结果进行有效性判定。当 3 瓶参考疫苗中至少 2 瓶计数结果在参考疫苗质量标准规定的范围内,且(37±0.5)℃ 培养 18~24 h 菌落大小均匀一致时,判定试验结果有效。此时将每批待检疫苗 3 瓶样品中含有活菌数的最小

值计为检验结果,根据制品质量标准进行判定。用于普通琼脂培养基质量控制时,每批普通琼脂培养基用 3 瓶参考疫苗进行检验,当不少于 2 瓶参考疫苗计数结果在参考疫苗协作标定范围内,且参考疫苗在(37±0.5)℃ 培养 18~24 h,菌落大小均匀一致时,判定培养基促生长能力符合规定。若参考疫苗计数结果高于参考疫苗协作标定的赋值范围,提示普通琼脂培养基的促生长能力偏高,若低于参考疫苗协作标定的赋值范围,提示普通琼脂培养基的促生长能力偏高。因此应在普通琼脂培养基质量标准的控制中添加促生长能力检验参数,符合规定的培养基用于检验,可以避免不必要的重复工作。若参考疫苗在普通琼脂培养基的质量控制中应用后还可以降低普通琼脂培养基促生长能力的批间差异,在效力检验(攻毒保护试验)估算菌数时即使更换培养基,对结果影响不大,保证试验的顺利进行。

参考文献:

- [1] 徐引弟,郭爱珍,陈焕春. 猪霍乱沙门氏菌的危害与防治[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3):115-117.
Xu Y D, Guo A Z, Chen H C. Harm and prevention of *Salmonella choleraesuis*[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2008,35(3):115-117.
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版[S]. 1-5.

- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia, Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition [S]. 1-5.
- [3] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇年版[S]. 164-165.
- Committee of Veterinary Biological products of Ministry of Agriculture, The veterinary biological products regulations of the People's Republic of China, 2000 edition [S]. 164-165.
- [4] 王楠,李旭妮,于晓辉,等. 布鲁氏菌病活疫苗活菌计数项目能力验证结果分析[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(5): 15-18.
- Wang N, Li X N, Yu X H, et al. Analysis of the proficiency testing of live bacteria counting of brucellosis vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(5): 15-18.
- [5] 刘明理,马玲云,苏丽红,等. 国家药品标准物质协作标定的技术要求与管理程序[J]. 中国药事, 2012, 26(7): 701-703.
- Liu M L, Ma L Y, Su L H, et al. The technical requirements and management procedures in collaborative calibration of national pharmaceutical reference standards [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2012, 26(7): 701-703.
- [6] CNAS GL 02:2006 能力验证结果的统计处理和评价指南[Z]. 中国合格评定国家认可委员会, 2006.
- CNAS GL 02:2006 Statistical of proficiency testing results and guidelines of competency assessment [Z]. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, 2016.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版[S]. 10.
- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition [S]. 10.
- [8] 徐颖华,李喆,张影. 中国 15 群钩端螺旋体代表菌株分群血清参考品的研制[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(9): 974-976.
- Xu Y H, Li Z, Zhang Y. Developing of typing antiserum references for fifteen Chinese representative *Leptospira* strain [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2018, 31(9): 974-976.
- [9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版[S]. 9.
- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition [S]. 9.
- [10] 卫辰,晁哲,王丽婵. 第 1 代百日咳毒素国家参考品的标定[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(8): 853-857.
- Wei C, Chao Z, Wang L C. Calibration of the first generation of national reference for pertussis toxin [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2018, 31(8): 853-857.
- [11] 李红,李娟,袁力勇. 腮腺炎减毒活疫苗国家参考品的制备及标定[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(20): 2450-2452.
- Li H, Li J, Yuan L Y. Preparation and calibration of the national reference for titration of live attenuated mumps vaccine virus [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(20): 2450-2452.
- [12] 9 CFR, Part 113.70, October 18, 2007. Supplemental Assay Method for Bacterial Count for *Pasteurella multocida*, Avian isolates Vaccines. United States Department of Agricultural Center for Veterinary Biologics testing Protocol.
- [13] 9 CFR, Part 113.67, November 29, 2007. Supplemental Assay Method for Bacterial Plate Count for *Erysipelothrix rhusiopathiae* Vaccines. United States Department of Agricultural Center for Veterinary Biologics testing Protocol.
- [14] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版[S]. 10.
- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition [S]. 9.

(编辑:李文平)