

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.11.04

鸡球虫病活疫苗不同卵囊计数方法的比较

张媛¹,任小侠¹,王秀丽¹,王楠¹,李建¹,张一帆¹,刘元杰¹,褚智菲²,
宋运娇²,于慧娟²,赵金羽³,高彬³,刘洋³,王晨旭³,张慧⁴,石宗昌⁴,
梁正鹏⁵,刘丽丹⁵,吴金香⁵,罗玉峰^{1*},李俊平^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081;2. 齐鲁青大生物制药有限公司,山东莱阳 265205;3. 天津赫莱恩特生物科技有限公司,天津 301702;
4. 西安斯凯达生物制品有限公司,西安 710399;5. 佛山市正典生物技术有限公司,广东佛山 528138)

[收稿日期] 2022-04-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 11-0023-09 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了解鸡球虫活疫苗不同卵囊计数方法对检测结果的影响,分别采用血细胞计数板 4 角方格法和 9 方格法以及麦氏计数板法对 3 种鸡球虫活疫苗各进行了 6 次卵囊计数,然后采用 *t* 检验和 *Z* 比分值方法比较筛选出最适宜的计数方法,并对检测方法进行了验证和变异系数统计。结果显示:采用每批检品抽检 1 瓶,通过血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次,去除最大值和最小值后取平均值作为该瓶检品卵囊计数结果,如果首次检验结果不符合规定可重检一次的方法,人员误差最小。该方法提高了鸡球虫活疫苗卵囊计数结果的可重复性和准确性,增强了疫苗质量控制的可靠性。

[关键词] 球虫;卵囊计数;比较

Comparison of Different Oocyst Counting Methods of Live Chicken Coccidiosis Vaccine

ZHANG Yuan¹, REN Xiao-xia¹, WANG Xiu-li¹, WANG Nan¹, LI Jian¹, ZHANG Yi-zhi¹,
LIU Yuan-jie¹, CHU Zhi-fei², SONG Yun-jiao², YU Hui-juan², ZHAO Jin-yu³, GAO Bin³,
LIU Yang³, WANG Chen-xu³, ZHANG Hui⁴, SHI Zong-chang⁴, LIANG Zheng-peng⁵,
LIU Li-dan⁵, WU Jin-xiang⁵, LUO Yu-feng^{1*}, LI Jun-ping^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Qilu Qingda Biopharmaceutical Co., Ltd, Laiyang, Shandong 265205, China; 3. Tianjin Hlinte Bio-tech Co., Ltd, Tianjin 301702, China; 4. Xi'an Skystar Bio-products Co., Ltd, Xi'an 710399, China; 5. Foshan Standard Biotechnology Co., Ltd, Foshan, Guangdong 528138, China)

Corresponding author: LUO Yu-feng, E-mail: luoyufengmy@163.com; LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

作者简介: 张媛,副研究员,从事寄生虫类生物制品的检测工作。

通讯作者: 罗玉峰, E-mail: luoyufengmy@163.com; 李俊平, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: In order to find the influence on the test results of different oocyst counting results of live chicken coccidiosis vaccine, the counting chamber 4 - corner square method, the counting chamber 9 square method and McMaster counting method were used in oocyst counting 6 times each. Then t - test and Z - ratio score method were used to select the most suitable counting method, the test method was verified and the coefficient of variation was counted. The results showed that each batch was sampled 1 bottle, and counted 6 repeats by the counting chamber 4 - corner square method. After removing the maximum value and the minimum value, average value was taken as the oocyst count result, it could be re - inspected once if the result not meet the requirements. This method had the smallest personnel error. The method improves the repeatability and accuracy of the counting results of oocysts of live chicken coccidiosis vaccine, and enhances the reliability of vaccine quality control.

Key words: coccidia; oocyst count; comparison

鸡球虫活疫苗中孢子化卵囊数直接关系到疫苗的安全及效力。我国已批准的 9 个鸡球虫活疫苗中有 7 个质量标准中有卵囊计数检验项目,但均未规定具体的计数方法,以上产品注册检验时提供的检验操作规程均采用血细胞计数板 4 角方格计数法进行^[1-3]。《欧洲药典》也要求对球虫活疫苗进行卵囊计数检验,规定选用适宜的计数板进行卵囊计数,也未明确具体的计数方法^[4]。有些国外产品,如捷克共和国 BIOPHARM 生物制品与兽药研究所生产的鸡球虫活疫苗采用麦氏计数板进行卵囊计数。美国国内球虫活疫苗无卵囊计数检验项^[5],如我国批准进口的由英特威美国分公司生产的肉鸡球虫活疫苗和种鸡球虫活疫苗^[6]。

目前,鸡球虫活疫苗在采用血细胞计数板 4 角方格计数法进行卵囊计数检验时,由于方法误差较大,常遇到检验结果不在标准规定范围内的情况,即使同一名检验员检测同一份样品,几次检验的结果间也不稳定,同时会出现低于下限和高于上限的情况,给结果判定造成了困扰。为了解鸡球虫活疫苗常用的不同卵囊计数方法对检测结果准确性的影响,进行了血细胞计数板 4 角方格法和 9 方格法以及麦氏计数板法对 3 种鸡球虫活疫苗卵囊计数结果的统计分析,从而筛选出更为稳定、准确、可靠、易操作的球虫卵囊计数方法,为鸡球虫活疫苗卵囊计数提供可靠的技术参考。

1 材料与方法

1.1 疫苗 疫苗 I 鸡球虫病四价活疫苗(柔嫩艾美耳球虫 ETGZ 株 + 毒害艾美耳球虫 ENHZ 株 + 堆型艾美耳球虫 EAGZ 株 + 巨型艾美耳球虫 EMPY 株),疫苗 II 鸡球虫病三价活疫苗(柔嫩艾美耳球虫 PTMZ 株 + 巨型艾美耳球虫 PMHY 株 + 堆型艾美耳球虫 PAHY 株),疫苗 III 鸡球虫病四价活疫苗(柔嫩艾美耳球虫 PTMZ 株 + 毒害艾美耳球虫 PNHZ 株 + 巨型艾美耳球虫 PMHY 株 + 堆型艾美耳球虫 PAHY 株),均为已注册上市产品。

1.2 样品处理 样品 A 为疫苗原液,样品 B 为疫苗用饱和食盐水稀释后的稀释液。

1.3 卵囊计数 疫苗 I、II、III 样品 A 用血细胞计数板进行计数;样品 B 用麦氏计数板进行计数。

1.3.1 血细胞计数板与麦氏计数板计数结果比较 由中国兽医药品监察所(简称“中监所”)的 4 名检验员用血细胞计数板 4 角方格法、血细胞计数板 9 方格法和麦氏计数板法分别重复计数 3 种疫苗中孢子化卵囊数 6 次,用 6 次计数结果平均值计算每羽份疫苗中含有的孢子化卵囊数作为统计值进行 t 检验,分析 3 种计数方法的差异显著性。 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异, $P < 0.01$ 则表示存在极显著性差异。

1.3.2 Z 比分值计算 选择 1.3.1 项中差异小的两种方法,由来自中监所和全国 4 家球虫疫苗生产企业的共 16 名检验员分别重复计数 3 种疫苗中孢子

化卵巢囊数 6 次。以第 1~3 次计数结果的平均值和 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值分别作为统计值,进行 Z 比分值计算。

根据 CNAS - GL02:2014 《能力验证结果的统计处理和评价指南》^[7] 中稳健统计方法,测定 Z 比分值,用于分析各检验员在总体检测结果中所处的位置。Z 比分值采用 X、XM、Norm IQR 来确定^[8]。

Z 比分值计算公式: $Z = (X - XM) / Norm\ IQR$

式中:Z 为稳健比分值;X 为检验数据;XM 为中位值;Norm IQR 为标准化四分位距, $Norm\ IQR = 0.7413 \times$ 四分位间距(IQR)。

判定标准为: $|Z| \leq 2$ 为满意结果; $2 < |Z| < 3$ 时,表示结果可疑; $|Z| \geq 3$ 为不满意结果。

1.3.3 不同人员之间变异系数的计算 将 1.3.2 项中出现可疑或不满意结果的人员数据剔除,用满意结果的人员数据进行不同人员之间变异系数的计算,分析不同人员之间计数结果的差异性。变异系数(C.V) = 标准差(s)/平均值(\bar{x}) × 100%。计数结果的变异系数越小说明计数结果的重复性越好。

1.3.4 不同方法计数结果比较 用 1.3.3 项中变

异系数最小的方法,与血细胞计数板 4 角方格 3 次平均值法对 16 名参比人员的检验结果进行判定,计算检验结果低于标准下限、符合标准和高于标准上限的概率,分析检验结果符合标准规定概率最高的检验方法。再由中监所的 9 名检验员对疫苗 I 采用新建立的计数方法与血细胞计数板 4 角方格 3 次平均值法进行检验,分析检验结果是否符合标准规定。

1.3.5 同一人员计数结果变异系数的计算 对中监所 9 名检验员的计数结果进行人员内变异系数的计算,根据 1.3.4 项中的判定结论,确定检验成立的变异系数范围。

2 结果与分析

2.1 血细胞计数板与麦氏计数板比对结果及统计分析 每种样品均由 4 名参比人员在相同条件下,分别采用血细胞计数板 4 角方格法、血细胞计数板 9 方格法和麦氏计数板法进行测试。从表 1 可见,麦氏计数板法计数结果明显低于血细胞计数板法,统计学分析表明血细胞计数板 4 角方格法和 9 方格法计数结果差异不显著($P = 0.9969$),但均显著高于麦氏计数板法计数结果($P < 0.05$),故采用血细胞计数板 4 角方格法和 9 方格法进行人员比对。

表 1 3 种计数方法计数结果平均值

Tab 1 Average oocyst counting results of 3 methods

人员编号	卵囊计数结果平均值/羽份*								
	4 角方格法			9 方格法			麦氏计数板法		
	疫苗 I	疫苗 II	疫苗 III	疫苗 I	疫苗 II	疫苗 III	疫苗 I	疫苗 II	疫苗 III
13	1479	365	1042	1512	345	1013	952	292	910
14	2094	456	1106	2082	466	1090	898	158	1130
15	1826	404	1120	1944	402	1080	369	316	697
16	1823	403	1299	1835	370	1266	861	255	831

* 检测值为用 6 次重复计数结果的平均值计算的每羽份疫苗中含有的孢子化卵巢囊数

2.2 Z 比分值计算 根据 Z 比分值计算公式,计算 16 名参比人员每种样品测定结果的 Z 值(血细胞计数板 4 角方格法结果见表 2,血细胞计数板 9 方格法结果见表 3)。结果显示,16 名参比人员中有 10 名出现可疑或不满意的计数结果,将此 10 人的计数结果剔除,用剩余 6 名参比人员(编号

01、02、11、13、14、15)的计数结果进行人员间变异系数的统计分析。

2.3 不同人员间计数结果变异系数计算 将 2.2 项中个别检验员可疑及不满意的检验结果剔除,计算剩余 6 名检验员之间计数结果的变异系数,结果见表 4、表 5,可知采用血细胞计数板 4

角方格法进行卵囊计数,同一样品重复计数 6 次,取 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值进行判定的方法变异系

数(10.94%)相对较低,说明采用这种方法进行卵囊计数,不同人员的检验结果差异性相对较小。

表 2 4 角方格法参比人员 Z 比分值统计处理结果汇总

Tab 2 Summary of statistical processing results of Z - score values by 4 - corner square method

人员编号	疫苗 I		疫苗 II		疫苗 III	
	Z 值 1 *	Z 值 2 *	Z 值 1 *	Z 值 2 *	Z 值 1 *	Z 值 2 *
01	0.1300	0.4167	0.0738	-0.8479	0.3153	-0.1718
02	1.1436	0.9586	0.9169	-0.0330	0.6657	0.4926
03	1.3170	1.0528	-1.1593	-1.8170	-0.1830	-0.0344
04	-0.7932	-1.0505	-0.7166	0.0991	<u>-4.8781</u>	<u>-3.4770</u>
05	0.2713	0.1757	-0.6956	-0.2973	<u>4.8548</u>	<u>2.4459</u>
06	-0.6368	-0.7474	1.4122	<u>2.7640</u>	-0.0350	0.5442
07	-1.2642	-1.6084	0.4532	0.2092	<u>2.8148</u>	1.2602
08	-0.1130	0.6877	0.8853	1.4866	-0.2297	-1.3805
09	-0.3919	-0.3019	1.7705	<u>7.6314</u>	-1.4288	-0.4468
10	-1.8407	-2.2950	-0.6323	-1.3985	<u>-2.4799</u>	<u>-2.0965</u>
11	-0.8629	-0.9403	0.5691	0.2092	1.1173	0.3781
12	-0.3580	-0.1251	-1.0960	-1.9491	<u>-2.5267</u>	<u>-2.2340</u>
13	0.1130	-0.4374	-0.8431	-0.9140	0.3932	-0.6645
14	0.8987	1.1286	0.4005	1.3104	-0.2842	0.1317
15	0.7028	0.1251	-0.0738	0.0110	0.0350	0.0344
16	0.6632	0.5086	-0.1265	-0.0110	<u>3.0250</u>	1.3289

* Z 值 1 为以第 1 次至第 3 次计数结果的平均值作为统计值计算的 Z 比分值;Z 值 2 为以 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值为统计值计算的 Z 比分值;加下划线为可疑或不满意的计数结果

表 3 9 方格法参比人员 Z 比分值统计处理结果汇总

Tab 3 Summary of statistical processing results of Z - score values by 9 - corner square method

人员编号	疫苗 I		疫苗 II		疫苗 III	
	Z 值 1 *	Z 值 2 *	Z 值 1 *	Z 值 2 *	Z 值 1 *	Z 值 2 *
01	0.3562	0.1677	0.1489	-0.0093	0.2488	-0.0515
02	1.2215	0.6962	0.4373	0.0464	0.6413	0.7016
03	1.9558	1.1957	-1.2373	<u>-2.0675</u>	0.2322	0.1219
04	-0.3959	-1.1595	-1.0978	-0.7139	<u>-3.5162</u>	<u>-3.1774</u>
05	0.8702	0.1967	-0.7071	-0.1576	<u>3.2729</u>	<u>2.2293</u>
06	-0.1677	-0.6890	1.3118	<u>2.7350</u>	0.0608	0.9779
07	-0.9992	-1.5915	0.2419	0.0093	1.9516	0.9779
08	0.0367	0.6504	1.1257	<u>2.0675</u>	0.5805	-0.5716
09	-0.1836	-0.5852	<u>2.7910</u>	<u>8.3535</u>	-0.7132	0.0190
10	-1.9061	<u>-2.6557</u>	-0.8187	-1.4927	<u>-2.1783</u>	<u>-2.1589</u>
11	-0.4356	-1.0678	0.4186	0.2318	0.5639	0.4090
12	-0.0367	-0.1677	-1.0513	-1.9377	<u>-2.1617</u>	<u>-2.4135</u>
13	0.6479	-0.6021	-0.8559	-1.2702	-0.1990	-0.5986
14	1.1619	1.0341	0.4652	1.2887	-0.3815	-0.0190
15	1.2612	0.5369	-0.1489	0.0093	-0.0608	-0.3386
16	-1.1738	0.4983	-1.4141	-0.6212	-0.9841	1.0266

* Z 值 1 为以第 1 次至第 3 次计数结果的平均值作为统计值计算的 Z 比分值;Z 值 2 为以 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值为统计值计算的 Z 比分值;加下划线为可疑或不满意的计数结果

表 4 4 角方格法参比人员卵囊计数结果变异系数

Tab 4 Results coefficient of variation of participants in the oocyst count comparison by using 4 – corner square method

人员编号	疫苗 I		疫苗 II		疫苗 III	
	值 1 *	值 2 *	值 1 *	值 2 *	值 1 *	值 2 *
01	1731	1799	417	367	1096	1096
02	2269	2035	497	404	1141	1212
11	1204	1208	464	415	1199	1192
13	1722	1427	330	364	1066	1010
14	2139	2109	448	465	1019	1149
15	2035	1672	403	406	1060	1132
平均值	1850	1708	427	404	1097	1132
标准差	351	318	53	34	59	66
变异系数	19.00%	18.61%	12.40%	8.35%	5.36%	5.87%

* 值 1 为第 1 次至第 3 次计数结果的平均值;值 2 为 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值

表 5 9 方格法参比人员卵囊计数结果变异系数

Tab 5 Results coefficient of variation of participants in the oocyst count comparison by using 9 – corner square method

人员编号	疫苗 I		疫苗 II		疫苗 III	
	值 1 *	值 2 *	值 1 *	值 2 *	值 1 *	值 2 *
01	1671	1710	427	402	1091	1107
02	2107	1929	458	405	1162	1246
11	1272	1198	456	415	1148	1192
13	1818	1391	319	334	1010	1006
14	2077	2069	461	472	977	1113
15	2127	1863	395	403	1035	1054
平均值	1845	1693	419	405	1071	1120
标准差	306	306	50	40	69	80
变异系数	16.58%	18.08%	12.04%	9.89%	6.43%	7.17%

* 值 1 为第 1 次至第 3 次计数结果的平均值;值 2 为 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值

2.4 不同方法计数结果比较 疫苗用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次后,将计数结果分别用第 1~3 次求平均值法,以及 6 次计数结果去除极值后剩余 4 次平均值法进行统计计算,结果见表 6。疫苗 I 的判定标准是每羽份疫苗中含有的孢子化卵囊数位于 1530~1870 之间为合格,疫苗 II 的判定标准是每羽份疫苗中含有的孢子化卵囊数位于 360~440 之间为合格,疫苗 III 的判定标准是每羽份

疫苗中含有的孢子化卵囊数位于 990~1210 之间为合格,从图 1 可知采用血细胞计数板 4 角方格法进行卵囊计数,同一样品重复计数 6 次,取 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值进行判定,计数结果的总体符合率要高于目前使用的 4 角方格法重复计数 3 次取平均值进行判定的检验方法。

表 6 不同取值方法计算结果

Tab 6 Calculation results of different value chosen methods

人员编号	疫苗 I		疫苗 II		疫苗 III	
	方法 1 *	方法 2 *	方法 1 *	方法 2 *	方法 1 *	方法 2 *
01	1731	1799	417	367	1096	1096
02	2269	2035	497	404	1141	1212
03	2361	2076	300	323	1032	1120
04	1241	1160	342	410	429	519
05	1806	1694	344	392	1679	1553
06	1324	1292	544	531	1051	1221
07	991	917	453	415	1417	1346
08	1602	1917	494	473	1026	885
09	1454	1486	578	752	872	1048
10	685	618	350	342	737	760
11	1204	1208	464	415	1199	1192
12	1472	1563	306	317	731	736
13	1722	1427	330	364	1106	1010
14	2139	2109	448	465	1019	1149
15	2035	1672	403	406	1060	1132
16	2014	1839	398	405	1444	1358

* 方法 1 为取第 1 次至第 3 次计数结果的平均值;方法 2 为取 6 次计数结果去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值

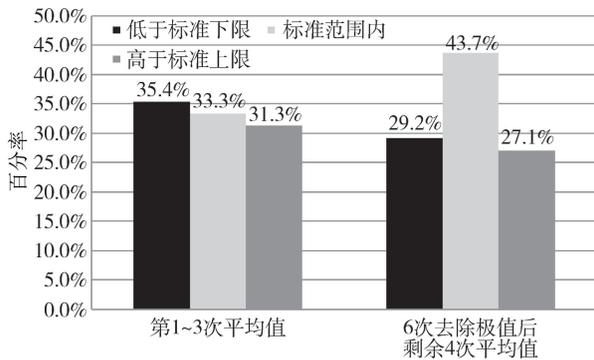


图 1 两种方法卵囊计数结果比较

Fig 1 Comparison of Oocyst Counting Results between Two Methods

中监所 9 名检验员用血细胞计数板 4 角方格法对疫苗 I 进行卵囊计数,每人重复计数 9 次,用 4 角方格 3 次平均值法和 4 角方格 6 次去除极值后剩余 4 次计数结果平均值法分析计数结果,对于 4 角方格 3 次平均值法,以第 1~3 次的平均值作为首检结果,如不符合规定,以第 4~6 次的计数结果

作为重检结果。对于 4 角方格 6 次去除极值后剩余 4 次计数结果平均值法,以第 1~6 次去除极值后剩余 4 次计数结果的平均值作为首检结果,如不符合规定,以第 4~9 次去除极值后剩余 4 次计数结果的平均值作为重检结果。从表 7 可见,采用每批检品抽检 1 瓶,每瓶使用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次,6 次计数结果中去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值作为该瓶检品卵囊计数结果,如首次检验不符合规定可重检一次的方法,可以最大程度统一不同人员的检验结论。

2.5 同一人员多次计数结果变异系数计算 对中监所 9 名检验员采用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次,6 次计数结果去除极值后剩余 4 次计数结果的变异系数进行计算,结果见表 8,可见 6 次计数结果中去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的变异系数可作为检验成立的条件,当变异系数 $\leq 20\%$ 时检验成立。

表 7 不同卵囊计数方法计数结果比较

Tab 7 Comparison of counting results between different oocyst counting methods

人员编号	3 次平均值法			6 次去除极大值和极小值后剩余 4 次平均值法		
	首检	重检	结论	首检	重检	结论
13	1617	/	符合规定	1544	/	符合规定
14	1483	1675	符合规定	1544	/	符合规定
15	2008	1858	符合规定	1825	/	符合规定
16	1900	1483	不符合规定	1588	/	符合规定
17	2042	2000	不符合规定	2044	1650	符合规定
18	1517	2383	不符合规定	1825	/	符合规定
19	1875	1467	不符合规定	1656	/	符合规定
20	1892	1283	不符合规定	1556	/	符合规定
21	1442	1600	符合规定	1544	/	符合规定

* 判定标准为每羽份疫苗中含有的孢子化卵囊数位于 1530 ~ 1870 之间。

表 8 去除极值后剩余 4 次计数结果变异系数统计

Tab 8 Coefficient of variation statistics of the remaining 4 times while total 6 times removed the maximum and minimum value method

人员编号	变异系数/%
13	14.09
14	3.86
15	8.16
16	12.62
17 首检	20.58
17 重检	19.05
18	16.12
19	8.95
20	7.85
21	6.10

3 讨论与结论

使用血细胞计数板可以直接进行疫苗检品卵囊计数,不需要进行稀释或浓缩。而麦氏计数板,由于计数室位于计数板的上层,需要使用大量饱和食盐水使卵囊漂浮于液体表面,和上层的计数室处于同一界面才可计数,用饱和食盐水对疫苗进行处

理的过程会引入误差,龚振兴等发现不同浓度、不同体积的饱和食盐水对卵囊的漂浮回收率为 55% ~ 97%^[9-10],本研究结果也表明使用麦氏计数板的计数结果显著低于血细胞计数板。而且,疫苗充分混匀后卵囊在疫苗中进行布朗运动,吸取的样品更能代表整瓶检品的质量,而加入饱和食盐水后,卵囊不断上浮,很难将其充分混匀,可见,不适宜用麦氏计数板代替血细胞计数板进行疫苗的卵囊计数检验。

血细胞计数板可以用于球虫卵囊的定量检测,但这种方法也存在一定的误差,这些误差包括技术误差和固有误差。技术误差包括加样量不准确、误把未孢子化卵囊计作孢子化卵囊、误把疫苗中的杂质计作卵囊等。研究结果也表明不同检验员卵囊计数的熟练程度有差别,16 名参比人员中有 10 人均出现了可疑或不满意的计数结果。技术误差可以通过规范检验操作和提高检验人员的熟练程度来避免或纠正,需要加强对检验员培训,统一行业操作方法。此外,固有误差包括计数板的精密度误差、方法自身存在的误差、卵囊在计数池内分布不均匀带来的误差等,也是导致计数结果不稳定的关键因素。研究结果表明,采用血细胞计数板 4 角方

格法重复计数 6 次,取 6 次计数结果中去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值计算每羽份疫苗中含有孢子化卵囊数的方法最能降低误差对检验结果的影响,使不同人员检验结论的一致性更高。从试验数据看,血细胞计数板 4 角方格法与 9 方格法在计数结果上没有显著差异,但血细胞计数板 4 角方格法较 9 方格法于操作上更简便。变异系数提示对同一瓶疫苗采用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次,取 6 次计数结果中去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值计算每羽份疫苗中含有孢子化卵囊数的方法较目前使用的重复计数 3 次取平均值进行计算的方法,人员间的差异更小,是较为理想的一种卵囊计数法。在今后的工作中应针对此方法建立标准操作规程,统一操作细节,规范操作手法,开展长期的、多次的比对活动,获取更多实验数据,从而提升球虫类活疫苗卵囊计数结果的准确性。

目前国内鸡球虫病活疫苗卵囊计数质量标准制定得较为严苛,王鹏等人^[1]与第三方检测机构对 8 批鸡球虫病疫苗进行了卵囊计数,自检与第三方机构检测结果均仅有 25% 的结果处于疫苗参考标准 $\pm 10\%$ 的范围内^[11]。疫苗计数结果的变异系数只有限定在 10% 以内才能保证计数结果处于疫苗参考标准 $\pm 10\%$ 的范围内,而目前所使用的采用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 3 次求平均值的检验方法,不同人员间的变异系数为 12.25%,高于 10%,以致会出现不同人员采用这种方法对同一产品进行检验,检验结果不稳定的情况。即使在改进方法后,采用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次,取 6 次计数结果中去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值计算每羽份疫苗中含有孢子化卵囊数的方法进行卵囊计数,把不宜作为统计数据的偏离结果去掉,不同人员间的变异系数(10.94%)有所降低,但仍要高于 10%。国外产品,如捷克共和国 BIOPHARM 生物制品与兽药研究所生产的鸡球虫病三价活疫苗,其质量标准要求每羽份含有每种球虫卵囊数为 300 ~ 500,即每羽份

含有的球虫卵囊数是 900 ~ 1500,标准变异系数约为 25%。在和企业检验员沟通过程中也发现,其在检验过程中如出现较高或较低的数据会进行舍弃,在本研究中不进行数据的挑选,16 名参比人员采用血细胞计数板 4 角方格 3 次平均值法,检品一次检验合格率仅为 33.3%,改用血细胞计数板 4 角方格法重复计数 6 次,取 6 次计数结果中去除极大值和极小值后剩余 4 次计数结果的平均值法后检品一次检验合格率提升为 43.7%。中监所 9 名检验员方法改进前后一次检验合格率可由 44.4% (4/9) 提升到 88.9% (8/9),必须进行重检才可达到 100% (9/9) 的检验合格率。可见,检验方法对检验结论有着决定性影响,为提升检验结论的可重复性,建议把卵囊计数方法收录至中国兽药典中,以便统一方法和操作,提升卵囊计数的准确性。同时,进一步修订我国鸡球虫病活疫苗卵囊计数质量标准(如参考标准 $\pm 20\%$),增加其科学性和合理性。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典二〇二〇年版三部[S].
Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (volume III, 2020) [S].
- [2] 农业部公告第 1780 号[S].
Announcement No. 1780 of the Ministry of Agriculture [S].
- [3] 农业农村部公告第 187 号[S].
Announcement No. 187 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs [S].
- [4] 欧洲药典 10.0[S].
European Pharmacopoeia 10.0 [S].
- [5] 美国兽医局备忘录第 800.123 号[S].
U. S. Veterinary Service Memorandum No. 800.123 [S].
- [6] 农业部公告第 2463 号[S].
Announcement No. 2463 of the Ministry of Agriculture [S].
- [7] CNAS - GL02:2014 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 中国合格评定国家认可委员会,2006.
CNAS - GL02:2014 Guidelines for statistical processing and proficiency assessment of proficiency testing results [S]. National Accreditation Service for Conformity Assessment of China, 2006.

- [8] GB/T 15483.1 - 1999. 利用实验室间比对的能力验证. 第一部分:能力验证计划的建立和运作[S].
GB/T 15483.1 - 1999. Verify the ability of comparison between laboratories. Part I: establishment and operation of capability verification plan [S].
- [9] 龚振兴, 魏红梅, 刘百林, 等. 饱和食盐水漂浮鸡球虫卵囊的用量和处理时间研究[J]. 湖南农业科学, 2019(6): 77 - 79.
Gong Z X, Wei H M, Liu B L, *et al.* Volume and treatment time of saturated salt solution in floating coccidia oocysts[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2019(6): 77 - 79.
- [10] 魏红梅, 龚振兴, 刘百林, 等. 几种常见试剂对柔嫩艾美耳球虫卵囊的漂浮效果[J]. 湖南农业科学, 2019(7): 78 - 80.
Wei H M, Gong ZH X, Liu B L, *et al.* Study on the floating effect of several common reagents on *Eimeria tenella* oocysts[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2019(7): 78 - 80.
- [11] 王鹏, 李海娟, 罗伟光, 等. 西北地区高床平养模式下 5 种球虫疫苗免疫效果的对比分析[J]. 现代农业科技, 2022(5): 178 - 184.
Wang P, Li H J, Luo W G, *et al.* Comparative analysis of immune effects of five coccidia vaccines under high bed and flat feeding mode in Northwest China [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2022(5): 178 - 184.

(编辑:李文平)