

• 生物技术与方法 •

链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的研制

辛凌翔¹, 王秀丽¹, 吕文静², 臧莲娜², 朱冬梅³, 罗颖³, 张媛¹, 李晓宁¹, 刘博¹, 李俊平¹

1 中国兽药药品监察所, 北京 100081

2 天津瑞普生物技术股份有限公司空港分公司, 天津 300300

3 华派生物工程集团有限公司, 四川 简阳 641400

辛凌翔, 王秀丽, 吕文静, 等. 链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的研制. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2554-2562.

Xin LX, Wang XL, Lv WJ, et al. Development of a reference substance for live bacterial count of *Streptococciosis* live vaccines. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2554-2562.

摘要: 研制链球菌病类活疫苗活菌计数参考品, 可以更加科学地评价活菌计数结果的准确性和有效性。首先, 制备了一批链球菌病类活疫苗活菌计数参考品, 对其物理性状、纯粹性、真空度、剩余水分进行检验, 并对其均一性、运输稳定性、热稳定性进行测定, 另组织 3 家单位通过协作标定的方式对参考品活菌数进行赋值, 用协作标定法统计参考品在 12 个月内的保存期。参考品的性状检查、纯粹检验、真空度测定和剩余水分测定结果均符合《中国药典》的规定; 均一性试验结果显示, 参考品计数结果的变异系数小于 10%, 均一性良好; 运输稳定性试验证明, 参考品在夏季和冬季用泡沫盒加冰袋的方式运输 3 日内数值仍能保持稳定; 加速热稳定性试验验证, 参考品在-20 °C 条件下保存 3 个月、4 °C 条件下保存 21 d 内均可活菌数稳定; 通过协作标定, 统计出参考品活菌数的赋值范围为 $(8.5-12.1) \times 10^7$ CFU/支; 保存期试验结果证实, 参考品在-70 °C 以下保存一年内活菌数可维持稳定状态。链球菌病类活疫苗活菌计数参考品, 不仅可以为链球菌病类活疫苗的活菌计数实验提供参照物, 而且可以用于评价马丁琼脂培养基的质量, 为兽用生物制品质量控制提供保障。

关键词: 链球菌, 活菌计数, 参考品, 协作标定

Received: July 8, 2020; **Accepted:** November 25, 2020

Supported by: Key Project of Veterinary Medicine Public Welfare in China Institute of Veterinary Drug Control (No. GY202010).

Corresponding author: Junping Li. E-mail: lijunping03@163.com

中国兽药药品监察所兽药行业公益性重点专项 (No. GY202010) 资助。

Development of a reference substance for live bacterial count of *Streptococciosis* live vaccines

Lingxiang Xin¹, Xiuli Wang¹, Wenjing Lv², Lianna Zang², Dongmei Zhu³, Ying Luo³, Yuan Zhang¹, Xiaoning Li¹, Bo Liu¹, and Junping Li¹

1 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

2 Tianjin Ringpu Bio-technology Co., Ltd. Airport Business Park Branch Company, Tianjin 300300, China

3 Huapai Bioengineering Group Co., Ltd., Jiayang 641400, Sichuan, China

Abstract: This study attempts to develop a reference substance for the live bacteria count of *Streptococciosis* live vaccines in order to evaluate the validity of live bacterial count in inspection and testing. We prepared a batch of live *Streptococcus suis* reference substance for live bacterial count, tested their physical property, purity, vacuum degree, remaining moisture, and determined their homogeneity, thermal stability and transportation stability. Moreover, we organized collaborative calibration to assign count values to the reference substance and determine the shelf life of the reference substance in 12 months. The results showed that the physical property, the purity, the remaining moisture and the vacuum degree of the reference substance were all in compliance with the requirements of the Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The homogeneity test showed that the coefficient of variation of the count of the reference substance was less than 10%, indicating a good homogeneity. Transportation stability test showed that the reference substance remained active after 72 h transportation in summer and winter with the package of styrofoam boxes and ice packs. Thermal stability test showed that the reference substance could be stored for up to 3 months at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, or up to 21 days at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. According to the collaborative calibration, the reference vaccine was assigned a count value range of $(8.5-12.1)\times 10^7$ CFU/ampoule. The shelf life test showed that the reference substance was stable for 12 months when stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. The reference substance could provide a reference for the live bacterial count of *Streptococciosis* live vaccines. Moreover, it could also be used as a reference to evaluate the quality of corresponding agar media.

Keywords: *Streptococcus*, live bacterial count, reference substance, collaborative calibration

链球菌病是由 β 溶血性链球菌引起的人畜共患病的总称，动物链球菌病中以猪、牛、羊、马、鸡较常见，水貂、犊牛、兔和鱼类也有发生链球菌病的报道^[1-3]。《中国兽药典》2015 年版三部中收录的链球菌病类活疫苗包括羊败血性链球菌病活疫苗和猪败血性链球菌病活疫苗 (ST171 株) 等^[4]。其中，活菌计数是该类疫苗质量标准的重要检验参数，其准确性对于评价疫苗的安全性和免疫效力具有重要意义。目前，我国已完成沙门菌病类活疫苗、巴氏杆菌病类活疫苗等兽用生物制品的活菌计数用参考品的研究^[5-6]，并且已初步将参考品应用于细菌类活疫苗活菌计数检验和相应琼脂培养基质量控制中，但尚无链球菌病类活疫苗活菌计数的参考品的研究。为使

活菌计数结果判定更为准确，本研究选择猪链球菌弱毒株 ST171 株作为参考菌株，研制链球菌病类活疫苗活菌计数的参考品，以期对链球菌病类活疫苗活菌计数时设参考品对照组，科学地保证疫苗活菌计数检验结果客观公正，从而提高检验的工作效率。链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的应用具有良好的前景和重要的意义，本品的科学应用可按照统一的参照物进行检验，科学分析和评价实验结果，有效提高检验工作效率。

1 材料与amp方法

1.1 材料

猪链球菌弱毒株 ST171 株、CVCC563，由中国兽医药品监察所提供。猪败血性链球菌病活

疫苗 (ST171 株), 购自广东永顺生物制药股份有限公司。新鲜马丁琼脂/肉汤培养基, 购自北京中海生物科技有限公司。马丁琼脂干粉, 购自北京中海生物科技有限公司和北京奥博星生物技术有限责任公司。一次性吸管 (1 mL、5 mL、10 mL), 购自 Costar 公司。一次性培养皿, 购自青岛金典生化器材公司。普通牛血清, 购自 Biological Industries 公司。

1.2 方法

1.2.1 参考品的制备、分发与保存

开启猪链球菌弱毒株 ST171 株冻干菌种, 用马丁肉汤稀释, 划线于含 10% 血清的马丁琼脂平板上, 37 °C 培养 24 h。选择光滑、稍大的菌落, 分别接种于马丁琼脂斜面上, 37 °C 培养 24 h。用少量马丁肉汤冲洗马丁琼脂斜面培养物, 收集菌液。按照菌液与疫苗冻干稳定剂 7:1 的比例, 向菌液中加入蔗糖明胶稳定剂。充分混合均匀后, 按照 1 mL/支的装量, 用定量分装器分装至安瓿内。分装后迅速冷冻真空干燥, 冻干后进行真空密封, 编号 2019001, 置 -70 °C 以下保存。随机选取 900 支参考品分为 3 组, 每组 300 支, 快递寄至 A 单位、B 单位和 C 单位。寄送时每组参考品置于隔热泡沫塑料盒内, 放入生物冰袋, 最外层包装为纸箱。各单位收到样品后立即置于 -70 °C 以下冰箱中保存。

1.2.2 参考品的质量检验

每次随机抽取 3-5 支参考品进行链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的质量检验, 分析其物理性状、真空度、剩余水分、纯粹性及活菌数。冻干后 1 周以内, 对新制备的参考品进行活菌计数, 作为保存期 0 个月时每支参考品的活菌数。操作方法参照《中国兽药典》2015 年版三部中 3001 兽用生物制品检验的一般规定、3103 真空度测定法、3204 剩余水分测定法、3306 无菌检验或纯粹检验法、3405 活菌计数法等^[4]。

1.2.3 培养基的制备与筛选

按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》2000 年版附录中的培养基制造方法^[7], 用 3 批不同来源的猪胃消化液, 配制新鲜马丁琼脂/肉汤培养基, 分别命名为“1 号新鲜马丁”、“2 号新鲜马丁”、“3 号新鲜马丁”。另用 2 家不同厂家生产的商品化马丁琼脂干粉按照产品说明书配制马丁培养基, 分别命名为“4 号马丁-中海”、“5 号马丁-奥博星”。用上述培养基对随机抽取 3 瓶商品化的链球菌病类活疫苗进行活菌计数, 筛选出适宜的培养基原材料。用筛选出的原材料制备马丁琼脂和马丁肉汤培养基, 用耐高压广口瓶密封后置于 2-8 °C 保存。

1.2.4 参考品的菌数测定

取 5 支试管, 第 1 支试管内加 10 mL 马丁肉汤, 作为稀释液用于稀释冻干参考品; 其余 4 支试管每管加 9 mL 马丁肉汤, 用于活菌计数的倍比稀释。从 -70 °C 冰箱取出冻干参考品, 恢复至室温。用注射器吸取第 1 支试管中的马丁肉汤, 将安瓿内的冻干参考品充分溶解, 反复吹吸, 将重新吸回水分的参考品全部吸至第 1 支试管中, 充分振荡混匀后, 再进行连续 10 倍系列稀释至第 5 管, 从第 5 管取菌液滴 3 个平板, 0.1 mL/个, 菌液铺均匀后 37 °C 培养 24 h, 记录活菌计数结果。

1.2.5 参考品的均一性试验及协作标定

随机抽取 10 支参考品进行活菌计数, 用统计学方法计算参考品计数结果的变异系数, 以评价其均一性。随机抽取 300 支参考品、120 瓶马丁琼脂 (100 mL/瓶)、60 瓶马丁肉汤培养基 (250 mL/瓶) 以及相关耗材寄给协作标定单位 A、B、C 共 3 家, 各单位随机抽取 2 名检验员, 每位检验员对 3 支参考品进行活菌计数, 每支参考品进行 2 次活菌计数的重复试验, 统计不同检验员在不同时间、不同实验室条件下对参考品活菌计数的结果^[8]。根据 CNAS-GL02:2006 《能力

验证结果的统计处理和评价指南》^[9]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 $\pm 2SD$ 作为参考品活菌数范围。Z 比分值采用 X、XM、Norm IQR 来确定。

1.2.6 参考品的加速热稳定性试验

随机抽取参考品分别置于 4 °C、25 °C、37 °C、-20 °C 条件下。在放置后的第 1、5、8、14、21、42、63、91 天, 每次随机抽取 3 支保存于不同条件下的参考品, 进行活菌计数。通过持续 13 周的监测, 评估参考品的稳定性^[10]。

1.2.7 参考品的运输稳定性试验

位于北京市的 C 单位在夏季 (6 月份) 和冬季 (12 月份) 分别从参考品中随机抽取 20 支向位于天津市的 A 单位和位于成都市的 B 单位寄送。寄送时每组参考品置于隔热泡沫塑料盒内, 放入生物冰袋, 最外层包装为纸箱。其中 C 单位至 A 单位的运输时间为 1 d, C 单位至 B 单位的运输时间为 3 d。各单位检验员收到参考品后即抽取 10 支进行活菌计数, 以分析运输过程对样品稳定性的影响。

1.2.8 参考品的保存期试验

将置于 -70 °C 以下保存的链球菌病类活疫苗活菌计数参考品每 2 个月取样并进行活菌计数, 至保存期 12 个月, 对计数结果进行统计分析, 每隔 4 个月对其性状、真空度、剩余水分测定一次。

2 结果与分析

2.1 链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的质量检验

链球菌病类活疫苗活菌计数参考品物理性状呈白色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。经纯粹检验, 参考品无杂菌生长。经剩余水分测定, 参考品剩余水分含量在 1.3%–1.5% 之间, 均小于 3.0%。经真空度测定, 安瓿内均可出现紫色辉光, 无失真空现象。对参考品进行活菌计数结果如表 1 所示, 计算保存期 0 个月时参考品的活菌数为 9.9×10^7 CFU/支。

2.2 链球菌病类活疫苗活菌计数参考品试验用培养基的确定

为保证试验的准确性, 培养基的筛选试验所用到的计数样品选择了已上市的规模化生产的猪败血性链球菌病活疫苗 (ST171 株)。2 名检验员分别用 5 种不同来源的培养基进行疫苗的活菌计数, 结果如表 2 所示。“1 号新鲜马丁”和“3 号新鲜马丁”培养基灵敏度较高, “4 号马丁-中海”和“5 号马丁-奥博星”培养基灵敏度较低。因此, 选择灵敏度适中的“2 号新鲜马丁”培养基作为试验用的统一培养基, 用“2 号新鲜马丁”的原材料大批量配制培养基, 用于后续参考品的研究。

2.3 均一性试验结果

随机抽取的 10 支参考品的均一性试验结果如表 3 所示, 计数单位以 $\times 10^7$ CFU/支计算, 活菌

表 1 保存期 0 个月时参考品的菌数测定

Table 1 The bacterial count of the reference substance at the beginning

Sample	Counting results at different dilutions (CFU/plate)			Viable counts (CFU/ampoule)	Average (CFU/ampoule)
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}		
1	/	87, 101, 109	7, 12, 15	9.9×10^7	
2	/	90, 106, 110	6, 11, 12	10.2×10^7	9.9×10^7
3	/	95, 105, 108	9, 13, 14	10.3×10^7	

Note: “/” represents the bacterial count ≥ 200 CFU and could not be counted.

表 2 不同培养基对疫苗的活菌计数结果

Table 2 Effect of different medium on live bacterial count

Sample number	Type of medium									
	Inspectors 1 ($\times 10^7$ CFU/dose)					Inspectors 2 ($\times 10^7$ CFU/dose)				
	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5
1	8.80	8.77	9.13 (H)	8.80	7.93 (L)	8.30 (H)	7.67	8.03	6.90	6.50 (L)
2	9.90	9.77	10.63 (H)	9.07 (L)	9.80	7.83	7.40	8.23 (H)	7.43	6.90 (L)
3	8.30	8.27	8.33 (H)	7.53	7.13 (L)	8.47	9.07	9.60 (H)	9.07	8.37 (L)

Note: "H" and "L" stand for the medium that counts the same sample with the largest and smallest number of bacteria, respectively.

表 3 均一性试验结果

Table 3 Results of homogeneity test

Sample	Viable count ($\times 10^7$ CFU/ampoule)	(Sample count-average) ²	Z score	Satisfaction degree
1	12.40	$1.7^2=2.89$	1.90	Satisfaction
2	11.80	$1.1^2=1.21$	1.30	Satisfaction
3	10.60	$-0.1^2=0.01$	0.50	Satisfaction
4	11.20	$0.5^2=0.25$	0.70	Satisfaction
5	10.50	$-0.2^2=0.04$	-0.50	Satisfaction
6	9.70	$-1.0^2=1.00$	-0.90	Satisfaction
7	11.10	$0.4^2=0.16$	0.60	Satisfaction
8	10.00	$0.3^2=0.09$	-0.60	Satisfaction
9	9.90	$-0.8^2=0.64$	-0.80	Satisfaction
10	9.80	$-0.9^2=0.81$	-0.90	Satisfaction
Average: 10.70		Total: 7.10		

计数的平均值为 10.70, 标准差为 0.84, 变异系数=标准差/平均值=7.90%, 变异系数小于 10%, 说明疫苗的均一性良好^[6]。

2.4 协作标定试验结果

A、B、C 三家单位的 6 名检验员对 18 支参考品计数的结果如表 4 所示, 34/36 结果满意, 1/36 结果可疑, 1/36 结果不满意。剔除不满意结果 ($|Z| > 2$ 的数据), 对 35 个结果进行统计, 计数单位为 $\times 10^7$ CFU/支。计数结果的平均值为 10.3, 中位数为 10.3, 变异系数为 8.7%, $XM \pm 2SD$ 为 8.5–12.1。因此, 本研究所制备的参考品的活菌计数结果赋值范围为 $(8.5-12.1) \times 10^7$ CFU/支。

2.5 运输稳定性试验结果

运输稳定性试验结果如表 5 所示, 参考品通过不同气温条件下的运输后, 计数结果均能在协

作标定的赋值范围内, 说明在 72 h 内的运输过程中参考品计数值可以保持稳定。

2.6 加速热稳定性试验结果

拟设定参考品的保存温度为 -70 °C 以下, 研究中进行了加速热稳定性试验, 以考核参考品在不同存放温度下的稳定性。分别于 1 d、5 d、8 d、14 d、21 d、42 d、63 d、91 d 对保存于不同条件下的参考品进行计数, 结果见图 1。参考品保存于 -20 °C 时较稳定, 保存于 4 °C 时 21 d 后菌数下降至协作标定赋值范围外, 保存于 25 °C、 37 °C 时第 1 天菌数下降到赋值范围外。 37 °C 温度存放时, 菌数下降最为迅速。保存于 -20 °C 91 d 后仍在协作标定赋值范围内, 加速热稳定试验结果符合参考品的试验特性。

表 4 协作标定试验结果

Table 4 Results of collaborative calibration test

Personnel	Sample	Viab le count ($\times 10^7$ CFU/ampoule)	Z score	Satisfaction degree
A-1	1	12.1	2.0	Suspicious
		11.6	1.5	Satisfaction
A-1	2	10.1	-0.2	Satisfaction
		9.4	-1.0	Satisfaction
A-1	3	11.6	1.5	Satisfaction
		11.2	1.0	Satisfaction
A-2	4	10.9	0.7	Satisfaction
		9.8	-0.6	Satisfaction
A-2	5	11.3	1.1	Satisfaction
		10.6	0.3	Satisfaction
A-2	6	9.7	-0.7	Satisfaction
		10.5	0.2	Satisfaction
B-1	7	10.3	0	Satisfaction
		10.2	-0.1	Satisfaction
B-1	8	10.2	-0.1	Satisfaction
		9.8	-0.6	Satisfaction
B-1	9	10.9	0.7	Satisfaction
		10.6	0.3	Satisfaction
B-2	10	9.2	-1.2	Satisfaction
		9.1	-1.3	Satisfaction
B-2	11	9.1	-1.3	Satisfaction
		9.4	-1.0	Satisfaction
B-2	12	9.2	-1.2	Satisfaction
		9.1	-1.3	Satisfaction
C-1	13	9.9	-0.4	Satisfaction
		10.7	0.4	Satisfaction
C-1	14	10.0	-0.3	Satisfaction
		9.7	-0.7	Satisfaction
C-1	15	10.5	0.2	Satisfaction
		8.7	-1.8	Satisfaction
C-2	16	11.9	1.8	Satisfaction
		10.6	0.3	Satisfaction
C-2	17	11.8	1.7	Satisfaction
		13.3	3.1	Dissatisfied
C-2	18	10.9	0.7	Satisfaction
		11.2	1.0	Satisfaction

2.7 保存期试验结果

按照协作标定的方法对 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存 12 个月的参考品候选物进行活菌计数,结果如表 6 所示。剔除无统计学意义的偏离数据^[9],变异系数为 6.0%–12.35%,平均数为 10.2×10^7 – 11.0×10^7 CFU/支,中位数为 10.2×10^7 – 11.1×10^7 CFU/支,均在活菌

计数可接受的误差范围内,且活菌计数结果在 12 个月内未随保存时间的延长而降低,保存期为 4 个月、8 个月、12 个月时分别随机抽取参考品候选物检查性状、真空度,结果均符合《中国兽药典》2015 版三部^[4]的规定,剩余水分均小于 3%。

表 5 运输稳定性试验结果

Table 5 Results of transportation stability test

Delivery organization	Sample	Counting results in summer ($\times 10^7$ CFU/ampoule)		Counting results in winter ($\times 10^7$ CFU/ampoule)	
		Inspectors 1	Inspectors 2	Inspectors 1	Inspectors 2
A	1	96	106	99	93
	2	86	85	103	116
	3	97	98	114	120
	4	97	104	97	95
	5	103	98	103	108
	6	97	96	85	110
	7	90	94	121	116
	8	85	88	100	108
	9	97	96	113	121
	10	90	93	111	121
B	11	121	111	110	113
	12	104	103	96	99
	13	115	98	110	110
	14	115	98	107	116
	15	109	121	109	108
	16	108	111	117	107
	17	121	120	110	115
	18	118	109	100	105
	19	113	94	91	94
	20	96	98	95	91

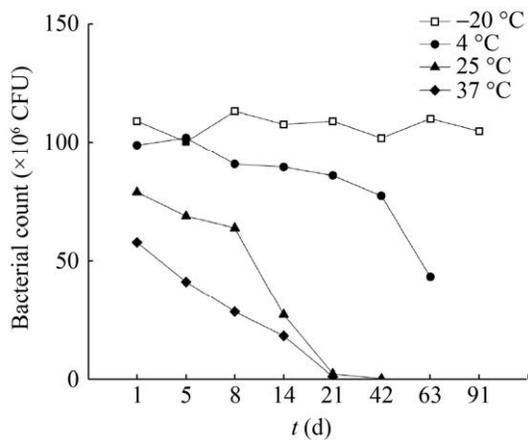


图 1 加速热稳定性试验结果

Fig. 1 Results of thermal stability test.

3 讨论

要保证细菌类活疫苗发挥有效防控效果的关键是对其进行质量控制。活菌数是用于评价疫苗安全性和免疫效力的重要参数，是疫苗质量的关键，也是检验细菌类生物制品的重点。为排除培养基和人员操作给活菌计数结果带来的不确定性，使用活菌计数参考品，可以对检验过程进行监督和参考，使检验结果更为准确^[11]。

根据《中国兽药典》三部通则“兽用生物制品国家标准物质制备和标定规定”^[4]、《中华人民共和国药典》三部通则“生物制品国家标准物质制备和

表 6 保存期试验结果

Table 6 Results of shelf life test ($\times 10^7$ CFU/ampoule)

Save time	Satisfaction	Upper quartile	Lower quartile	Interquartile range	Medium number	Average	Coefficient of variation (%)	Satisfaction range
2m	35/36	10.65	9.60	1.05	10.2	10.2	7.90	8.6–11.8
4m	36/36	11.80	10.25	1.55	11.1	11.0	9.50	8.8–13.1
6m	35/36	10.75	10.40	0.75	10.4	10.4	6.00	9.1–11.6
8m	36/36	11.50	9.10	2.40	10.4	10.3	12.35	7.7–12.8
10m	36/36	10.80	9.65	1.15	10.2	10.2	8.50	8.4–12.0
12m	36/36	10.80	9.80	1.00	10.3	10.4	8.80	8.5–12.2

标定规程^[12]以及《国家药品标准物质协作标定的技术要求与管理程序》^[7]中对生物制品国家标准物质制备及标定的要求,本研究制备和标定了链球菌活疫苗活菌计数参考品。该批参考品的性状、纯粹性、活菌计数、剩余水分含量、真空度均符合《中国兽药典》中链球菌病类活疫苗的质量标准^[13]。

在参考品的制备过程中,对于参考品的包装,不同于以往的西林瓶搭配胶塞和铝塑盖的方式,本研究采用了安瓿抽真空包装的方式,主要是为避免低温保存过程中橡胶制品收缩而导致的失真空现象,保存期试验表明安瓿包装的参考品在一年内可确保真空度合格。对于参考品的计数单位,不同于兽用生物制品活菌计数的单位“CFU/头份”,本研究采用“CFU/支”为计数单位。“CFU/头份”为《中国兽药典》^[4]中活菌计数检验参数的单位,这样表述便于用活菌计数的结果来评价疫苗在动物体内使用的实际效果。但活菌计数参考品并不涉及动物体内使用,而是更多的在效力检验及培养基质量控制等实验中应用,所以用“CFU/支”作为计数单位更为恰当。

在培养基的筛选过程中,采用了《中国兽药典》^[4]中规定的马丁肉汤及马丁琼脂培养基。在细菌培养中,对不同来源的培养基进行研究并优化培养基配方,对于研究可以起到促进和指导作用^[14]。根据《中国兽药典》^[4]中 3704 检验用培养基配制法中的配方要求,我们发现来源不同的猪胃消化液,对培养基的使用效果影响较大。

本研究通过选购不同来源的猪胃消化液,进而筛选出适用于链球菌病类活疫苗活菌计数参考品研制的培养基。

本研究中参与试验的 A、B、C 三家单位所用的冻干参考品、培养基、各类试验耗材等生产批号完全一致,最大限度地免去了除人员操作外的可能误差。通过均一性试验,验证参考品变异系数为 7.9%,均一性良好。通过协作标定,对参考品定值为活菌数 $(8.5-12.1)\times 10^7$ CFU/支。通过加速热稳定性试验证明,参考品-20 °C 保存 3 个月以内活菌数稳定;在 25 °C 及 37 °C 保存 1 d 活菌数即会下降,而在 4 °C 可保存 21 d,表明该参考品必须冷链运输。通过运输稳定性试验进一步证明,参考品在夏季和冬季由泡沫盒加冰袋的方式运输不超过 72 h 的情况下,数值均能保持稳定。通过定期监测参考品的性状、纯粹性、剩余水分含量、活菌数等参数,证明本参考品可在-70 °C 保存 12 个月内保持稳定。本研究可以为链球菌病类活疫苗活菌计数参考品质量标准的制定提供可靠依据。

REFERENCES

- [1] 寇利伟. 链球菌病的诊断与防治. 山东畜牧兽医, 2018, 39(5): 25-26.
Kou LW. Diagnosis and control of streptococcal disease. Shandong J Animal Sci Vet Med, 2018, 39(5): 25-26 (in Chinese).
- [2] Cole JN, Henningham A, Gillen CM, et al. Human pathogenic streptococcal proteomics and vaccine

- development. *Proteom Clin Appl*, 2008, 2(3): 387-410.
- [3] Saralahti A, Rämetsä M. Zebrafish and streptococcal infections. *Scand J Immunol*, 2015, 82(3): 174-183.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版. 北京: 中国农业出版社, 2016. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. *China Veterinary Pharmacopoeia III*, 2015 Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2016 (in Chinese).
- [5] 王秀丽, 张媛, 李红霞, 等. 沙门氏菌类活疫苗活菌计数参考疫苗的研究. *中国兽药杂志*, 2019, 53(3): 19-25. Wang XL, Zhang Y, Li HX, et al. Study on reference vaccine for bacterial plate count of *Salmonella* vaccines. *Chin J Vet Drug*, 2019, 53(3): 19-25 (in Chinese).
- [6] 王秀丽, 刘博, 辛凌翔, 等. 多杀性巴氏杆菌类活疫苗活菌计数参考品的研究. *中国兽医杂志*, 2019, 55(9): 34-37, 42. Wang XL, Liu B, Xin LX, et al. Study on reference vaccine for bacterial plate count of *Pasteurella multocida* vaccines. *Chin J Vet Med*, 2019, 55(9): 34-37, 42 (in Chinese).
- [7] 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 2000 年版. 北京: 化学工业出版社, 2000. Veterinary Biological Products Regulations Committee, Ministry of Agriculture. People's Republic of China, *Veterinary Biological Products Regulations 2000 Edition*. Beijing: Chemical Industry Press, 2000 (in Chinese).
- [8] 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. *中国药事*, 2012, 26(7): 701-703. Liu ML, Ma LY, Su LH, et al. Technical requirements and management procedures in collaborative calibration of national pharmaceutical reference standards. *Chin Pharmac Aff*, 2012, 26(7): 701-703 (in Chinese).
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. 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 processing of results of proficiency testing and guidelines for proficiency evaluation[Z]. China National Accreditation Board for Conformity Assessment (CNAC) (in Chinese).
- [10] 李翠, 郭彩云, 戴志红, 等. 测定鸡传染性法氏囊病活疫苗(B87 株)参考品有效期的经典热加速稳定试验. *中国兽药杂志*, 2014, 48(02):11-13. Li C, Guo CY, Dai ZH, et al. Accelerated thermostability test of living infectious bursal disease vaccine (B87 Strain). *Chin J Vet Drug*, 2014, 48(2):11-13 (in Chinese).
- [11] 9 CFR, Part 113. 67, November 29, 2007. Supplemental assay method for bacterial plate count for *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccines. United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics testing Protocol.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Volume III*, 2015 Edition. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press, 2015 (in Chinese).
- [13] 曹丽梅, 刘明理, 袁伟媛, 等. 国家药品标准物质在生物制品质量控制中的应用. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(9): 1054-1056. Cao LM, Liu ML, Yuan WY, et al. Application of national drug reference materials in quality control of biological products. *Chin J Biol*, 2019, 32(9): 1054-1056 (in Chinese).
- [14] 林晗, 田苏英. 细菌培养基中营养物质的代谢及优化方法. *生物化工*, 2018, 4(3): 138-139, 142. Lin H, Tian SY. Metabolism and optimization of nutrient substance in bacterial culture medium. *Biol Chem Eng*, 2018, 4(3): 138-139, 142 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)