

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.11.04

# 兽用生物制品活菌计数方法改进的研究

张一帜, 张媛, 李建, 王秀丽, 刘元杰, 王楠, 徐磊, 辛凌翔, 任小侠,  
刘博, 魏津, 马欣, 彭小兵, 李旭妮, 彭国瑞, 李俊平, 罗玉峰\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-07-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 11-0022-08 [中图分类号] S859.79

**[摘要]** 活菌计数是细菌类活疫苗质量标准中重要的检验参数, 与疫苗的保护效果显著相关。现行兽用细菌类生物制品检验中的活菌计数方法部分步骤易产生误差, 试验成立标准表述笼统, 最终影响到细菌活疫苗质量评判。因此, 从检验实际需求出发, 参照国内外活菌计数相关规程, 通过对比试验研究, 对“活菌计数法”中平板干湿程度、菌液滴加方法、菌液分散方法进行改进, 提出及验证以标准差( $s$ )衡量结果的有效性并提供参考值。改进后的方法要求更明确, 普适性更高, 从而减少了操作误差, 提升了“活菌计数法”的规范性、可操作性及检验结果可靠性。

**[关键词]** 活菌计数法; 细菌活疫苗; 检验技术方法

## Improvement Study of Standard Bacterial Plate Count for Veterinary Biological Products

ZHANG Yi-zhi, ZHANG Yuan, LI Jian, WANG Xiu-li, LIU Yuan-jie, WANG Nan,  
XU Lei, XIN Ling-xiang, REN Xiao-xia, LIU Bo, WEI Jin, MA Xin, PENG Xiao-bing,  
LI Xu-ni, PENG Guo-rui, LI Jun-ping, LUO Yu-feng\*

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

Corresponding author: LUO Yu-feng, E-mail: luoyufengmy@163.com

**Abstract:** The bacterial plate count is a critical test parameter in the quality standard for bacterin and is significantly related to the protective effect of bacterin. At present, some steps in the bacterial plate count method are prone to errors, and the test valid requirement is generally stated, which ultimately affects the quality evaluation of live bacterial vaccines. Therefore, based on the actual test requirements, this study referred to the relevant regulations for bacterial plate count in China and abroad. Through the comparing experiments, moist degree of the plate, the way of adding the bacteria droplets, the way of dispersing the bacteria liquor had been adjusted and improved. The standard deviation ( $s$ ) was proposed and verified to measure the validity of the

**基金项目:** 中国兽医药品监察所所级课题: 细菌类活疫苗活菌计数方法的研究(201803)

**作者简介:** 张一帜, 助理研究员, 从事细菌类生物制品检测工作。

**通讯作者:** 罗玉峰。E-mail: luoyufengmy@163.com

results, and a reference value was provided. The improved method requirements were more clear and more universal, which reduced operational errors and improved the standardization, operability and reliability of the bacterial plate count method.

**Key words:** bacterial plate count; live bacterin vaccine; technique and method of drug control

活菌计数是细菌类活疫苗质量标准中重要的检验参数,与疫苗的保护效果关系紧密<sup>[1]</sup>。现行兽用细菌类生物制品检验中的活菌计数方法依照《中国兽药典》(2015 年版三部)附录 3405“活菌计数法”执行<sup>[2]</sup>,但其中有部分内容过于笼统,试验成立条件缺乏科学标准,以至于全国各疫苗生产企业检验人员对方法的要求有理解上的差别,造成企业间乃至同企业人员间检验结果经常出现差异,最终影响细菌活疫苗质量的评判。因此,本研究拟参照国内外活菌计数相关规程,通过试验比对研究,对“活菌计数法”进行修订,使该方法要求更明确,普适性更高,从而减少操作误差,提升“活菌计数法”的规范性、可操作性及检验结果可靠性。

目前美国农业部兽医生物制品检验所依照的美国联邦法规第九卷(9 CFR)中,对于活菌计数方法有着明确要求<sup>[3]</sup>,并于 2015 年完善修订了标准操作规程(BBSOP0019.04)<sup>[4]</sup>。相对于我国所用的活菌计数方法,主要有两点不同:①在将稀释液滴加于平板这一操作中,所使用的仪器量程不同,我国采用 1 mL 量程的吸管滴加 0.1 mL 菌液,而美国采用 100~200  $\mu$ L 量程的移液器滴加 0.1 mL 菌液;②在滴加菌液后,我们目前所用方法是靠倾斜和转动将菌液分散,而美国使用无菌涂布器将菌液涂布开。本研究针对当前活菌计数法三个方面关键点,参考美国农业部兽药生物制品中心公开的 SOP(BBSOP0019.04)和多位检验员的操作建议,对于平板干湿程度、滴加平板仪器、菌液分散方法进行单变量比对试验,提出操作更方便、更精准、容错率更高的“活菌计数法”的修订方案,并进一步提出以标准差(*s*)衡量结果的有效性 & 提供参考值。

1 材料与方法

1.1 实验材料 待检样品、吸管(1 mL、5 mL、10

mL)、试管(18 mm×18 cm)、15 mL 离心管、50 mL 离心管、培养皿(直径 9 cm)、无菌涂布器、200  $\mu$ L 移液器和配套吸头;待检样品所需稀释液及固体培养基(本实验所用稀释液及固体培养基均购自北京中海生物科技有限公司)参照表 1。

表 1 不同细菌产品活菌计数用稀释液及适宜培养基对应表  
Tab 1 Correspondence table of diluent and suitable medium for different bacterial products plate count

| 产品种类       | 稀释液及适宜培养基                                      |
|------------|------------------------------------------------|
| 多杀性巴氏杆菌类制品 | 马丁肉汤、含 0.1% 裂解血细胞全血及 4% 健康动物血清(或含 10% 鲜血)的马丁琼脂 |
| 沙门氏菌类制品    | 马丁肉汤、马丁琼脂,或普通肉汤、普通琼脂                           |
| 大肠杆菌类制品    | 普通肉汤、普通琼脂                                      |
| 丹毒杆菌类制品    | 马丁肉汤、含 10% 健康动物血清(或鲜血)的马丁琼脂                    |
| 链球菌类制品     | 马丁肉汤、含 10% 健康动物血清(或鲜血)的马丁琼脂                    |
| 布氏菌类制品     | 胰蛋白胍肉汤、胰蛋白胍琼脂                                  |

1.2 仪器设备 微波炉、恒温水浴箱、生物安全柜、37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱、涡旋振荡仪、电动移液器、废弃液体及吸管存放用容器。

1.3 试验方法

1.3.1 培养平板制备 根据待检样品种类选取相应琼脂培养基加热融化,冷却至 50~60  $^{\circ}$ C 后于生物安全柜中加入相应营养成分(37  $^{\circ}$ C 预热)后制备平板,每付培养皿加入琼脂 15~20 mL。待平板凝固后进行预培养或装入塑封袋 4  $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 稀释菌液 按待检产品质量标准所规定的每头(羽)份样品应至少含有的活菌数或科研实验要求确定样品的稀释倍数。先进行放大稀释,再进行 10 倍系列稀释,稀释过程中通过使用涡旋振荡

器或上下颠倒混匀保证菌液稀释液充分混匀,最终稀释度选择每付培养皿上生长的菌落数 40 ~ 200 CFU 为宜。

**1.3.3 滴平板** 用 1 mL 吸管或 200  $\mu$ L 移液器分别从最终稀释管中吸取菌液,滴于 3 个平板上,100  $\mu$ L/平板。之后转动平板或用无菌涂布器将菌液涂均匀(3 个平板用同一个涂布器的同一边进行涂布,涂布时注意不要将菌液涂布到平板边缘)。之后盖上平板盖正置于培养箱中,30 min 后将平板倒置,培养至适宜时间。

**1.3.4 计算菌数** 肉眼观察并计数平板中的菌落,算出 3 个平板的平均菌落数,再乘以总体稀释度(包括放大稀释和连续稀释)倍数,再乘以 10(每付平板滴加菌液 0.1 mL),即为每 1.0 mL 原样品中所含的菌数,再除以疫苗的头(羽)份数,即为每头(羽)份疫苗中所含有的活菌数。

**1.3.5 数据统计** 使用 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) 软件以及 SPSS 16.0 软件对于实验结果进行统计学分析,其中以平均值  $\pm$  标准平均误差 ( $s_x$ ) 表示。数据分析采用  $t$  检验法来比较各组间差异。其中 ns ( $P > 0.05$ ),即 no significant,表示无显著差异,\* ( $P < 0.05$ ) 表示有显著差异,\*\* ( $P < 0.01$ ) 表示差异十分显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 活菌计数法相关步骤的优化

**2.1.1 平板干湿程度** 《中国兽药典》(2015 年版三部)附录 3405 收录的“活菌计数法”对于平板干湿程度没有提出明确要求。检验员们的多年操作经验均认为平板干湿程度对于活菌计数试验至关重要。为确定平板干湿程度,考虑到操作方法的普适性和易操作性,本研究采取将制备平板完成后(平板凝固)进行预培养,以预培养时间量化平板干湿程度。本次试验使用仔猪副伤寒沙门氏菌活疫苗参考品进行活菌计数,马丁琼脂平板在制备完成凝固后(倒板后 30 min),转移至培养箱进行预培养 0.5 ~ 48 h 不等(图 1)。分别取出预培养不同时间的马丁琼脂平板进行活菌计数,将适宜浓度的菌液

滴加至平板上,转动倾斜引导菌液在平板上均匀分散之后放入培养箱中,在不开盖的情况下正置 30 min 后倒置培养 24 h,观察各个平板中菌落是否出现堆叠、是否在边缘生长并记录计数结果。

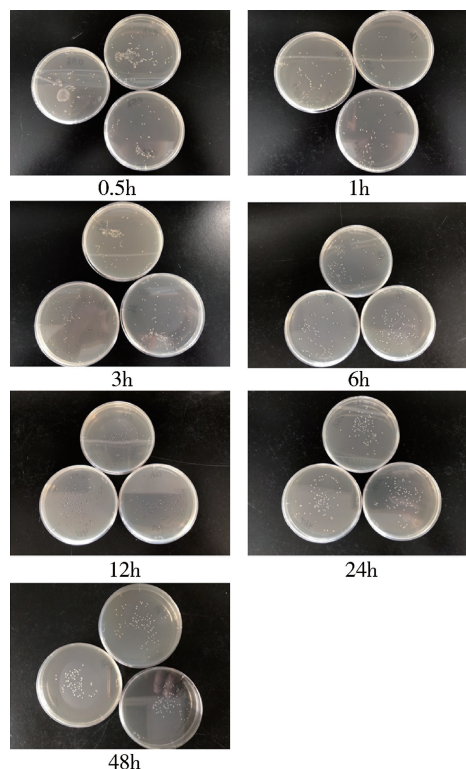


图 1 不同预培养时间平板进行活菌计数结果(0.5 ~ 48 h)

Fig 1 Bacterial plate count results on plates with different pre - culture time (0.5 ~ 48 h)

结果显示平板预培养 12 ~ 24 h 后进行活菌计数试验能够顺利计数,菌落分布无异常情况。而预培养小于 12 h 的平板会因过湿而导致菌落堆叠、菌落贴边生长,最终无法计数。预培养 48 h 由于平板过干,菌液无法充分分散,部分菌落出现重叠情况,从而影响计数结果。因此平板最好预培养 12 ~ 24 h 后再进行活菌计数试验。

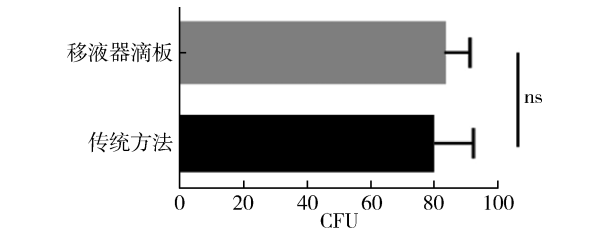
**2.1.2 滴加菌液** 将稀释液滴加于平板这一操作步骤,目前采用 1 mL 量程的吸管滴加 0.1 mL 菌液的方法,而美国与欧洲使用 100 ~ 200  $\mu$ L 量程的移液器滴加 0.1 mL 菌液。在正确合规的操作下,引用误差越小,准确度越高,而引用误差是绝对误差的最大值与仪表量程的比值,即与仪器量程负相

关<sup>[5]</sup>。从仪器规格来看,选用量程更符合使用体积的仪器更为精确。

为验证两种滴加菌液方法对于活菌计数试验的影响,本研究分别使用两种方法进行多次活菌计数试验,所用样品及其他步骤完全相同,将所得结果进行统计学分析。结果说明使用移液器滴加菌液方法与传统方法无显著性差异,可以互相替代,而且移液器滴加菌液方法的标准差和标准误均小于传统方法,说明移液器方法的离散程度更低,随机误差更小(表 2 和图 2)。

表 2 不同仪器滴加菌液活菌计数结果统计表

| Tab 2 Bacterial plate count statistics with different instruments |      |    |    |    |    |          |       |       |
|-------------------------------------------------------------------|------|----|----|----|----|----------|-------|-------|
| 试验分组                                                              | 计数结果 |    |    |    |    | 标准差      | 平均值   | 标准误   |
| 传统方法                                                              | 95   | 85 | 74 | 72 | 59 | 11.87314 | 80.4  | 3.066 |
|                                                                   | 70   | 89 | 84 | 92 | 73 |          |       |       |
|                                                                   | 93   | 88 | 96 | 71 | 65 |          |       |       |
| 移液器滴板                                                             | 80   | 90 | 67 | 91 | 71 | 8.03445  | 83.13 | 2.074 |
|                                                                   | 92   | 81 | 78 | 89 | 92 |          |       |       |
|                                                                   | 91   | 82 | 88 | 76 | 79 |          |       |       |



ns, 即 no significant, 表示无显著差异,  $P>0.05$

图 2 不同仪器滴加菌液活菌计数结果

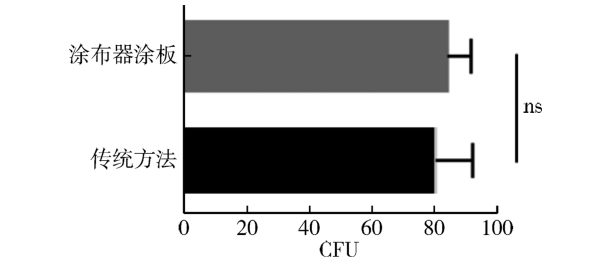
Fig 2 Bacterial plate count results with different instruments

2.1.3 菌液分散 将稀释液滴加于平板这一操作步骤,我国目前采用倾斜和转动平板将菌液分散,而美国与欧洲使用无菌涂布器将菌液涂布开。为验证两种菌液分散方法对于活菌计数试验的影响,本研究分别按照传统旋转倾斜法和涂布法进行菌液分散,进行多次活菌计数试验,所用样品及其他步骤完全相同,将所得结果进行统计学分析。结果

显示使用涂布器分散菌液方法与传统方法无显著性差异,可以互相替代,而且涂布器分散菌液方法的标准差和标准误均小于传统方法,说明涂布法的离散程度更低,随机误差更小(表 3 和图 3)。

表 3 不同菌液分布方式活菌计数结果统计表  
Tab 3 Bacterial plate count statistics in different distribution methods

| 试验分组  | 计数结果 |    |    |    |    | 标准差      | 平均值  | 标准误   |
|-------|------|----|----|----|----|----------|------|-------|
| 传统方法  | 95   | 85 | 74 | 72 | 59 | 11.87314 | 80.4 | 3.066 |
|       | 70   | 89 | 84 | 92 | 73 |          |      |       |
|       | 93   | 88 | 96 | 71 | 65 |          |      |       |
| 涂布器分散 | 76   | 90 | 86 | 94 | 71 | 7.542262 | 84.2 | 1.947 |
|       | 87   | 88 | 82 | 77 | 88 |          |      |       |
|       | 96   | 79 | 86 | 73 | 90 |          |      |       |



ns, 即 no significant, 表示无显著差异,  $P>0.05$

图 3 不同菌液分布方式活菌计数结果

Fig 3 Bacterial plate count results in different distribution methods

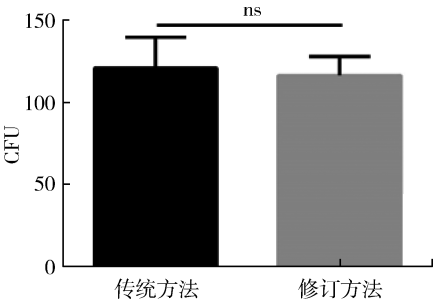
2.2 修订方法与传统方法比对 本研究第一部分通过单变量试验确定了平板适宜预培养的时间,之后验证使用移液器滴加菌液和用涂布器分散菌液可以替代原方法,且结果的离散程度小于原方法。在原方法的基础上,使用移液器滴加菌液和用涂布器分散菌液,在此我们称之为“修订方法”。第二部分我们使用修订方法与目前的传统方法进行比对。将同一样品分别使用传统方法和修订方法进行比对试验,结果显示两种方法没有显著性差异,可以互相替代,而且修订方法的标准差和标准误均小于传统方法,说明修订方法的离散程度更低,随机误差更小(表 4 和图 4)。



表 4 活菌计数传统方法与修订方法比对结果统计表

Tab 4 Comparison between traditional method and revised method for bacterial plate count

| 试验分组 | 计数结果 |     |     | 标准差   | 平均值   | 标准误   |
|------|------|-----|-----|-------|-------|-------|
| 传统方法 | 133  | 122 | 113 | 19.05 | 120.7 | 6.349 |
|      | 113  | 83  | 107 |       |       |       |
|      | 144  | 131 | 140 |       |       |       |
| 修订方法 | 116  | 108 | 108 | 8.84  | 115.2 | 3.819 |
|      | 132  | 116 | 111 |       |       |       |
|      | 115  | 105 | 126 |       |       |       |



ns, 即 no significant, 表示无显著差异,  $P>0.05$

图 4 活菌计数传统方法与修订方法比对结果

Fig 4 Comparison between traditional method and revised method for bacterial plate count

2.3 结果平行性条件优化 在《中国兽药典》(2015 年版三部)附录 3405 收录的“活菌计数法”中,在重检要求中对于结果平行性方面做出了规定:“如果有片状菌落生长,或同一稀释度平板间菌落相差 50% 以上时,应重检。”其中对于活菌计数结果平行性的要求表述过于笼统,(最大值 - 最小值)/ $N \geq 50\%$  则该次检验不成立,而其中  $N$  并没有明确指出是什么值,是否是平均值或其他具体某一个样本数值,以至于该评判标准在实际应用中会产生标准不一的问题。“最大值 - 最小值”在统计学中称为极差,是用来反映刻画一组数据的离散程度和变异范围,但由于极差只指明了测定值的最大离散范围而不包括全部测量值的信息,并且极差易受极端值影响,因此不能反映其间样本的分部情况。此外,从公式(最大值 - 最小值)/ $N$  值可以看出,数值大小与  $N$  的关系成反比。在活菌计数结果在规

定范围(40 ~ 200) 内的情况下, $N$ (一般取平均值)越低,(最大值 - 最小值)/ $N$  值越大,即此种方法对于数据离散性的衡量会因  $N$  值大小不同产生差异。

本研究提出使用标准差作为衡量活菌计数结果平行性的指标<sup>[6]</sup>。为确定既符合现行平行性要求,又符合活菌计数结果实际情况的标准差值,我们将本研究中进行活菌计数的数据(表 5)以及多位检验员验证活菌计数修订方法的数据(均符合当前数据平行性规定)(表 6、表 7)进行整理,计算每组结果(3 个平板为一组)的标准差和传统方法中提出的“(最大值 - 最小值)/平均值”。

表 5 本研究活菌计数结果平行性指标分析 - 1

Tab 5 Analysis of the parallel index of the bacterial plate count in this study - 1

| 数据来源             | 1   | 2   | 3   | 标准差  | 极差/<br>平均值 | 平均值   | 标准误  |
|------------------|-----|-----|-----|------|------------|-------|------|
| 传统方法             | 84  | 99  | 115 | 15.5 | 31.2/%     | 99.3  | 8.95 |
|                  | 69  | 84  | 99  | 15.0 | 35.7/%     | 84.0  | 8.66 |
|                  | 75  | 88  | 91  | 8.5  | 18.9/%     | 84.7  | 4.91 |
|                  | 75  | 84  | 101 | 13.2 | 30.0/%     | 86.7  | 7.62 |
|                  | 95  | 70  | 93  | 13.9 | 29.1/%     | 86.0  | 8.02 |
|                  | 85  | 89  | 88  | 2.1  | 4.6/%      | 87.3  | 1.20 |
|                  | 74  | 84  | 96  | 11.0 | 26.0/%     | 84.7  | 6.36 |
|                  | 72  | 92  | 71  | 11.8 | 26.8/%     | 78.3  | 6.84 |
|                  | 59  | 73  | 65  | 7.0  | 21.3/%     | 65.7  | 4.06 |
|                  | 80  | 92  | 91  | 6.7  | 13.7/%     | 87.7  | 3.84 |
| 移液器<br>单变量<br>试验 | 90  | 81  | 82  | 4.9  | 10.7/%     | 84.3  | 2.85 |
|                  | 67  | 78  | 88  | 10.5 | 27.0/%     | 77.7  | 6.06 |
|                  | 91  | 89  | 76  | 8.1  | 17.6/%     | 85.3  | 4.70 |
|                  | 71  | 92  | 79  | 10.6 | 26.0/%     | 80.7  | 6.12 |
|                  | 76  | 87  | 96  | 10.0 | 23.2/%     | 86.3  | 5.78 |
| 涂布器<br>单变量<br>试验 | 90  | 88  | 79  | 5.9  | 12.8/%     | 85.7  | 3.38 |
|                  | 86  | 82  | 86  | 2.3  | 4.7/%      | 84.7  | 1.33 |
|                  | 94  | 77  | 73  | 11.2 | 25.8/%     | 81.3  | 6.44 |
|                  | 71  | 88  | 90  | 10.4 | 22.9/%     | 83.0  | 6.03 |
|                  | 133 | 122 | 113 | 10.0 | 16.3/%     | 122.7 | 5.78 |
| 传统方法             | 113 | 83  | 107 | 15.9 | 29.7/%     | 101.0 | 9.17 |
|                  | 144 | 131 | 140 | 6.7  | 9.4/%      | 138.3 | 3.84 |
|                  | 116 | 108 | 108 | 4.6  | 7.2/%      | 110.7 | 2.67 |
| 修订方法             | 132 | 116 | 111 | 11.0 | 17.5/%     | 119.7 | 6.33 |
|                  | 115 | 105 | 126 | 10.5 | 18.2/%     | 115.3 | 6.06 |

表 6 本研究活菌计数结果平行性指标分析 -2

| Tab 6 Analysis of the parallel index of the bacterial plate count in this study -2 |     |     |     |      |            |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|------------|-------|-------|
| 数据来源                                                                               | 1   | 2   | 3   | 标准差  | 极差/<br>平均值 | 平均值   | 标准误   |
| 不同<br>检验员<br>传统<br>方法                                                              | 103 | 118 | 126 | 11.7 | 19.9/%     | 115.7 | 6.74  |
|                                                                                    | 138 | 121 | 142 | 11.2 | 15.7/%     | 133.7 | 6.44  |
|                                                                                    | 114 | 146 | 115 | 18.2 | 25.6/%     | 125.0 | 10.50 |
|                                                                                    | 109 | 83  | 111 | 15.6 | 27.7/%     | 101.0 | 9.02  |
|                                                                                    | 127 | 93  | 98  | 18.4 | 32.1/%     | 106.0 | 10.60 |
|                                                                                    | 103 | 103 | 107 | 2.3  | 3.8/%      | 104.3 | 1.33  |
|                                                                                    | 99  | 108 | 103 | 4.5  | 8.7/%      | 103.3 | 2.60  |
|                                                                                    | 110 | 93  | 96  | 9.1  | 17.1/%     | 99.7  | 5.24  |
|                                                                                    | 66  | 70  | 56  | 7.2  | 21.9/%     | 64.0  | 4.16  |
|                                                                                    | 42  | 54  | 44  | 6.4  | 25.7/%     | 46.7  | 3.71  |
|                                                                                    | 70  | 46  | 62  | 12.2 | 40.4/%     | 59.3  | 7.06  |
|                                                                                    | 46  | 64  | 56  | 9.0  | 32.5/%     | 55.3  | 5.21  |
|                                                                                    | 64  | 42  | 57  | 11.2 | 40.5/%     | 54.3  | 6.49  |
|                                                                                    | 56  | 60  | 43  | 8.9  | 32.1/%     | 53.0  | 5.13  |
|                                                                                    | 55  | 46  | 40  | 7.5  | 31.9/%     | 47.0  | 4.36  |
|                                                                                    | 61  | 51  | 48  | 6.8  | 24.4/%     | 53.3  | 3.93  |
|                                                                                    | 112 | 135 | 102 | 16.9 | 28.4/%     | 116.3 | 9.77  |
|                                                                                    | 133 | 108 | 115 | 12.9 | 21.1/%     | 118.7 | 7.45  |
|                                                                                    | 108 | 125 | 116 | 8.5  | 14.6/%     | 116.3 | 4.91  |
|                                                                                    | 98  | 105 | 128 | 15.7 | 27.2/%     | 110.3 | 9.06  |
|                                                                                    | 180 | 166 | 179 | 7.9  | 8.0/%      | 175.0 | 4.55  |
|                                                                                    | 196 | 175 | 182 | 10.7 | 11.4/%     | 184.3 | 6.17  |
|                                                                                    | 188 | 176 | 197 | 10.2 | 10.9/%     | 186.9 | 5.87  |
|                                                                                    | 165 | 181 | 188 | 11.8 | 13.0/%     | 178.0 | 6.79  |

如表 5 - 表 7 所示,各组结果的极差/平均值均在 50% 以内,符合现行结果平行性要求。而各组标准差值均小于 20,且浮动范围较为集中于 15 ~ 5 之间,占整个样本量的 74%。这说明即使在操作符合规定的情况下,每次检验的 3 个结果之间还是会出现差距,这是由试验当中的随机误差所引起的,而标准差正是衡量此随机误差的一把尺子,应当符合随机误差的基本规律——呈正态分布。使用 SPSS16.0 软件对于标准差数据进行两种正态分布检验 (Shapiro - Wilk 检验及 Kolmogorov - Smirnov

表 7 本研究活菌计数结果平行性指标分析 -3

| Tab 7 Analysis of the parallel index of the bacterial plate count in this study -3 |     |     |     |      |            |       |      |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|------------|-------|------|
| 数据来源                                                                               | 1   | 2   | 3   | 标准差  | 极差/<br>平均值 | 平均值   | 标准误  |
| 不同<br>检验员<br>修订<br>方法                                                              | 131 | 128 | 111 | 10.8 | 16.2/%     | 123.3 | 6.23 |
|                                                                                    | 148 | 120 | 134 | 14.0 | 20.9/%     | 134.0 | 8.08 |
|                                                                                    | 120 | 140 | 123 | 10.8 | 15.7/%     | 127.7 | 6.23 |
|                                                                                    | 126 | 110 | 117 | 8.0  | 13.6/%     | 117.7 | 4.63 |
|                                                                                    | 85  | 89  | 90  | 2.6  | 5.7/%      | 88.0  | 1.53 |
|                                                                                    | 65  | 78  | 71  | 6.5  | 18.2/%     | 71.3  | 3.76 |
|                                                                                    | 94  | 79  | 92  | 8.1  | 17.0/%     | 88.3  | 4.70 |
|                                                                                    | 67  | 56  | 84  | 14.1 | 40.6/%     | 69.0  | 8.14 |
|                                                                                    | 51  | 68  | 58  | 8.5  | 28.8/%     | 59.0  | 4.93 |
|                                                                                    | 70  | 58  | 52  | 9.2  | 30.0/%     | 60.0  | 5.29 |
|                                                                                    | 84  | 58  | 58  | 15.0 | 39.0/%     | 66.7  | 8.67 |
|                                                                                    | 46  | 60  | 66  | 10.3 | 34.9/%     | 57.3  | 5.93 |
|                                                                                    | 52  | 55  | 54  | 1.5  | 5.6/%      | 53.7  | 0.88 |
|                                                                                    | 43  | 56  | 62  | 9.7  | 35.4/%     | 53.7  | 5.61 |
|                                                                                    | 48  | 56  | 49  | 4.4  | 15.7/%     | 51.0  | 2.52 |
|                                                                                    | 66  | 45  | 50  | 11.0 | 39.1/%     | 53.7  | 6.33 |
|                                                                                    | 121 | 118 | 102 | 10.2 | 16.7/%     | 113.7 | 5.90 |
|                                                                                    | 100 | 118 | 110 | 9.0  | 16.5/%     | 109.3 | 5.21 |
|                                                                                    | 104 | 119 | 113 | 7.5  | 13.4/%     | 112.0 | 4.36 |
|                                                                                    | 118 | 116 | 107 | 5.9  | 9.7/%      | 113.7 | 3.38 |
|                                                                                    | 186 | 195 | 193 | 4.5  | 4.6/%      | 191.2 | 2.62 |
|                                                                                    | 189 | 180 | 181 | 5.1  | 5.0/%      | 183.2 | 2.92 |
|                                                                                    | 194 | 177 | 183 | 8.6  | 9.1/%      | 184.6 | 4.94 |
|                                                                                    | 188 | 197 | 190 | 4.8  | 4.8/%      | 191.3 | 2.75 |

检验),结果均为显著 (Sig > 0.05 即正态分布) (图 5 - 图 7),这证实了前文中的观点,说明标准差可以作为衡量活菌计数结果平行性的标准,并能够有效地描述随机误差。

3 讨论与结论

国内外目前对活细菌的计数有许多方法,其中滴板计数是一种比较常用且简便的计数方法。该方法根据估算对于液体菌液进行 2 ~ 10 倍梯度稀释,之后将终稀释液滴加到计数板上,在显微镜下计数,之后乘以相应的稀释倍数,能够快速即时测

| Tests of Normality |                                 |    |       |              |    |      |
|--------------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
|                    | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |      |
|                    | Statistic                       | df | Sig.  | Statistic    | df | Sig. |
| 标准差                | .083                            | 73 | .200* | .985         | 73 | .512 |

a. Lilliefors Significance Correction  
\*. This is a lower bound of the true significance.

图 5 标准差数据正态分布检验结果 -1

Fig 5 Normal distribution test results of Standard Deviation data -1

| Descriptives |                                  |             |  | Statistic | Std. Error |
|--------------|----------------------------------|-------------|--|-----------|------------|
| 标准差          | Mean                             |             |  | 9.4822    | .45566     |
|              | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound |  | 8.5739    |            |
|              |                                  | Upper Bound |  | 10.3905   |            |
|              | 5% Trimmed Mean                  |             |  | 9.4516    |            |
|              | Median                           |             |  | 9.7000    |            |
|              | Variance                         |             |  | 15.156    |            |
|              | Std. Deviation                   |             |  | 3.89313   |            |
|              | Minimum                          |             |  | 1.50      |            |
|              | Maximum                          |             |  | 18.40     |            |
|              | Range                            |             |  | 16.90     |            |
|              | Interquartile Range              |             |  | 4.70      |            |
|              | Skewness                         |             |  | .122      | .281       |
|              | Kurtosis                         |             |  | -.251     | .555       |

图 6 标准差数据正态分布检验结果 -2

Fig 6 Normal distribution test results of Standard Deviation data -2

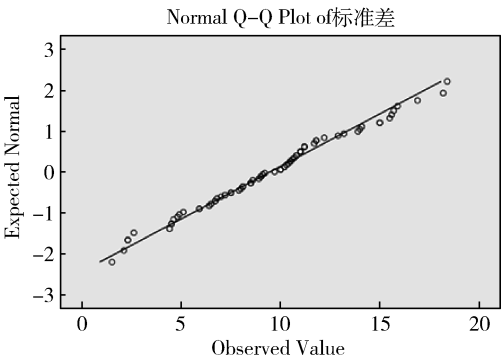


图 7 标准差数据正态分布检验结果 -3

Fig 7 Normal distribution test results of Standard Deviation data -3

得菌液中的活菌数量<sup>[7]</sup>。Seo EY 等利用荧光显微技术对于大量细菌进行快速计数<sup>[8]</sup>。Bogomolny E

等建立了利用固体激光器使用光学方法实时测定活细菌数量的方法,结果稳定、高效、精确<sup>[9]</sup>。London R 等开发了自动化生长微生物直接检测技术,通过微生物荧光标记和激发荧光,能够快速自动区分不同的原核、真核微生物并即时完成计数<sup>[10]</sup>。这些先进方法或需要使用昂贵的仪器试剂,或需对不同细菌的估算值进行更多的数据积累。

本研究针对当前活菌计数法的三个方面关键点,参考美国农业部兽药生物制品中心公开的 SOP (BBSOP0019.04) 和多位检验员的操作建议,通过单变量比对试验改进了活菌计数平板的干湿度要求,使得检验用平板干湿度能够实现均匀分散且

不易流边,同时排除了之前方法当中的生物安全隐患;确定了滴平板仪器,使用量程更适合、精确度更高、操作更方便的仪器进行菌液的滴加,减少了系统误差并且使得操作更为简单;选择涂布器进行菌液分散,也使得整个方法更易操作,菌落分散均匀且不易流边。

原方法中对于各平板结果平行性的要求较为模糊,缺少统计学支撑。本研究提出使用标准差衡量活菌计数结果的平行性,标准差是离均差平方的算数平均数的平方根,即方差的算术平方根,是反映一组数据离散程度最常用的一种量化形式,是表示精确度的重要指标。当使用活菌计数方法进行检测时,由于检测方法总是有误差的,所以检测值并不是其真实值。设定一个只取决于检测值与真实值之间的差距,而与真实值大小无关的稳定性指标,才是评价检测方法最有决定性的指标,从而保证每批检验结果的准确可靠<sup>[11]</sup>。进一步通过实验统计数据证实,活菌计数实验中随机误差所引起的结果标准差变化,是符合随机误差的基本规律——呈正态分布的。

本研究以试验数据为基础,比对分析后对于相关规程制修订提出了意见,希望能够对细菌类兽用生物制品相关从业者在生产研究、制定规程等方面提供帮助和启发。

## 参考文献:

- [1] 王楠,李旭妮,于晓辉,等.布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 ability verification results of the live bacterial count project of brucellosis live vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(5): 15-18
- [2] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典 2015 版三部[S].中国农业出版社,2016:21-23.
- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition[S].

China Agriculture Press, 2016: 21-23.

- [3] 陈光华,夏业才,杨京岚,等.美国兽医生物制品法规与技术标准[M].中国农业出版社,2019:794-798.
- Chen G H, Xia Y C, Yang J L, *et al.* The Laws, Regulations, and Technical Standards on Veterinary Biologics in the United States[M]. China Agriculture Press, 2019: 794-798.
- [4] United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics. Standard Operating Policy/Procedure: Standard Bacterial Plate Count[EB/OL]. 2015(02). [https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/veterinary-biologics/biologics-regulations-and-guidance/ct\\_vb\\_pros\\_bb](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/veterinary-biologics/biologics-regulations-and-guidance/ct_vb_pros_bb)
- [5] 王福顺.相对误差与引用误差在选用测量仪表中的应用[J].计量与测试技术,1997(1):21-23.
- Wang F S. The Application of relative error and reference error in selecting measuring instruments[J]. Metrology and Measurement Technique, 1997(1): 21-23.
- [6] 盛骤.概率论与数理统计第三版[M].高等教育出版社,2001:213-223.
- Sheng Z. Probability Theory and Mathematical Statistics 3<sup>rd</sup> edition[M]. Higher Education Press, 2001: 213-223.
- [7] Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(2). 121-129.
- [8] Seo Eun-Young, Ahn Tae-Seok, Zo Young-Gun. Agreement, precision, and accuracy of epifluorescence microscopy methods for enumeration of total bacterial numbers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(6): 1981-1991.
- [9] Bogomolny E, Swift S, Vanholsbeeck F. Total viable bacterial count using a real time all-fibre spectroscopic system[J]. The Analyst, 2013, 138(14): 4112-4119.
- [10] London Roanna, Schwedock Julie, Sage Andrew, *et al.* An automated system for rapid non-destructive enumeration of growing microbes[J]. PloS One, 2010, 5(1):e8609.
- [11] 王应明,张军奎.基于标准差和平均差的权系数确定方法及其应用[J].数理统计与管理,2003:22-26.
- Wang Y M, Zhang J K. Method and application of weight coefficient determination based on standard deviation and average deviation[J]. Journal of Applied Statistics and Management, 2003: 22-26.

(编辑:李文平)