

新增附录 球虫孢子化卵囊计数法（标准草案）

对于球虫类制品，除另有规定外，卵囊计数均采用此方法。

1 检品处理

随机取检品 3 瓶，充分混匀后各自作为卵囊计数用样品，分别按下列步骤进行计数。

2 加样

吸取检品 1 滴（约 20 μ l），通过毛细血管虹吸效应沿盖玻片与血细胞计数板间的加样缝隙加入两侧计数室（下图所示），以铺满计数室为宜。加样过程中若产生气泡应更换血球计数板重新加样。



正面示意图

侧面示意图

图 1 血细胞计数板示意图

1—血细胞计数板；2—盖玻片；3—加样位置

3 计数

3.1 将血细胞计数板置于显微镜的载物台上夹稳，静置 3~5 分钟，待卵囊沉降到血细胞计数板上，不再随盖玻片及液体漂移后观察。

3.2 用 10 \times 20 倍镜头下采用暗视野观察并计数。按对角线方位，数左上、左下、右上、右下的 4 个角方格（即 64 小格）的孢子化卵囊数，如卵囊位于角方格的线上，上线和左线上的卵囊计入本角方格，下线和右线上的卵囊不计入。血细胞计数板两个计数室 4 个角方格中含有的孢子化卵囊总和分别为第 1 次（S1）和第 2 次计数（S2）。

3.3 按步骤 2 和步骤 3 中的 3.1~3.2 进行两次重复，计数结果分别为第 3 次（S3）、第 4 次（S4）、第 5 次（S5）和第 6 次计数（S6）。

3.4 结果计算

3.4.1 分别计算每瓶中的孢子化卵囊数：

每瓶孢子化卵囊数 = $(S1+S2+S3+S4+S5+S6) \div 6 \times 2500 \times \text{装量 (ml)} \div \text{每瓶羽 (头) 份数}$

3.4.2 检品中每羽（头）份中的孢子化卵囊数：

检品中每羽（头）份的孢子化卵囊数 = $(\text{瓶 1 中孢子化卵囊数} + \text{瓶 2 中孢子化卵囊数} + \text{瓶 3 中孢子化卵囊数}) \div 3$

4 结果判定

根据制品标准进行判定，应符合规定。

起草说明：

1. 本标准是在“SYZY020-2022 球虫类制品卵囊计数操作规程I”的基础上起草而成。本标准属于首次起草。

2. 本标准中所采用的方法、步骤、结果判定原则综合了 2021 年相关企业能力比对结果以及 2022 年检验部门人员比对研究结果所确定，并按相关委员意见及建议进行适当修改。

3. 影响球虫孢子化卵囊计数结果的因素较多，如血细胞计数板质量、检品浓度、是否添加助悬剂、计数人员经验等。但通过保障血细胞计数板质量、控制检品浓度、多次计数取平均值等可大大降低计数结果的偏差。

4. 依据 2024 年度第 5 次会的审查意见修改如下：（1）本标准仅取 1 瓶作为检品，是否参照“凡例”中“活菌（芽孢）计数”规定取 3 瓶，由起草小组参阅资料决定取样数量。未采纳的原因是取样数量越大，计数结果出现偏差的可能性越大，难以控制其变异系数。（2）检测样品的处理，建议不加助悬剂混悬液。（3）国内现有球虫活疫苗的孢子化卵囊计数变异系数都要求在 10% 以内，不同意将变异系数扩大为 20% 以内。（4）注意事项 5.2“建议采用进口血细胞计数板”应修改为“采用符合要求的血细胞计数板”。（5）进一步完善了标准及起草说明，并提供修改的理由和依据。

5. 依据 2024 年度第 13 次会议审查意见，进行了如下完善：（1）将检品数量改为取 3 瓶，分别计数，得到每头（羽）份孢子化卵囊数后，将 3 瓶的数值取平均值，作为检品的最终孢子化卵囊数。（2）如有公开的血细胞计数板的质量标准，在正文中体现出来，如没有就不必加以强调。（3）将 3.3 表述为“两次重复”，无需赘述。（4）规范性删除了孢子化卵囊的特征和参考图。（5）删除了对变异系数的相关要求，并对相应文字进行修改。（6）明确结果采用 3 瓶的平均值。（7）删除了“重检”相关规定。（8）将注意事项中的必要内容体现在正文中。原注意事项中规定每个计数室计数结果在 200~300 之间，是建立在离心、添加助悬剂可调节卵囊浓度的基础上，现已取消添加助悬剂，该要求也一并取消了。