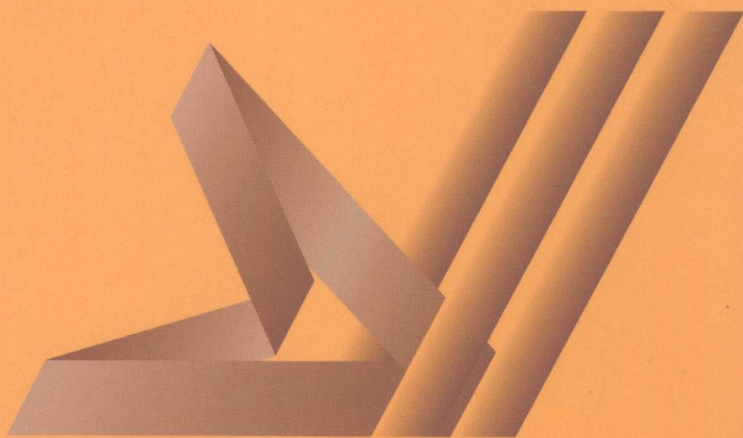


兽医生物制品制造工艺 理论与实践

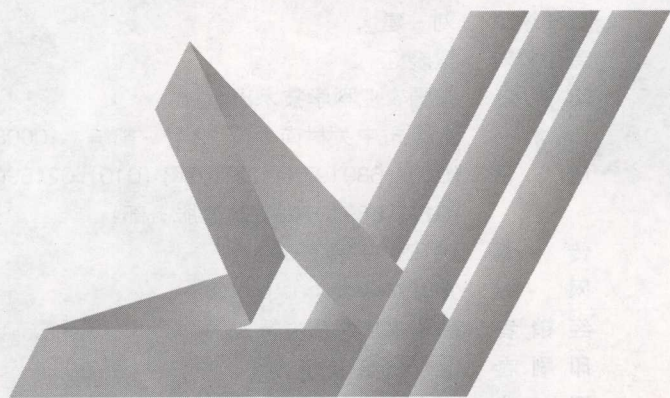
傅 牧 编著



中国农业科学技术出版社

兽医生物制品制造工艺 理论与实践

傅 牧 编著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

兽医生物制品制造工艺理论与实践/傅牧编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2007.11

ISBN 978-7-80233-444-1

I. 兽… II. 傅… III. 兽医学—生物制品 IV. S859.79

—中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 171185 号

责任编辑 刘 建

责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 68919704 (发行部) (010) 62189014 (编辑室)
(010) 68919703 (读者服务部)

传 真 (010) 68919709

网 址 <http://www.castp.cn>

经销者 新华书店北京发行所

印刷者 北京科信印刷厂

开 本 850 mm × 1168mm 1/32

印 张 8.875

字 数 250 千字

版 次 2007 年 11 月第 1 版 2007 年 11 月第 1 次印刷

定 价 18.00 元

前 言

兽医生物制品是动物防疫的重要武器，属特殊的商品，不仅需要有效，更需要安全。兽医生物制品生产加工的对象是生物活性物质（包括转基因生物），从研制开发到使用的全过程都存在着生物安全方面的因素和风险。由于这种特殊的原因，决定了兽医生物制品制造业是技术密集型的产业，产品在制造过程中的每道工序都必须有严格的技术要求。

生物制品制造又是多学科共同参与、互相渗透的边缘学科，其中免疫学是基础，生物学、生物化学、物理学是生物制品制造的依据和手段。有关这方面的知识在很多论著中已作了详尽的论述，本书特予省略，把侧重点放在介绍生产工艺和操作方面。

现在有一种普遍的看法，认为企业经过了技改，通过了国家的考核验收，达到了 GMP 标准，企业的产品自然优良。应该肯定，企业经过技改并达到了 GMP 的要求，确实是构建了兽医生物制品生产的良好环境，为产品质量的提高提供了保证。但企业达到了 GMP 要求，并不等于企业的所有产品都优良，优良产品的形成，还得要靠科学，靠掌握了科学技术的人去打造。

为了配合 GMP 企业全员培训工作的开展，编者对自己从事兽医生物制品制造多年的实践和体会进行了认真回忆和整理，并汇编成《兽医生物制品制造工艺理论与实践》。本书对初入行者可能会有一定的启发和帮助。由于本书从理论上阐述生物制品及其制造工艺方面的东西太少，因此，不能冒昧称它为“××学”，而是把它当作一般科技读物向读者推介，供广大基层兽医

人员、在校大专院校学生工作、学习之余阅读，增加一点兽医生物制品制造方面的知识。兽医生物制品品种繁多，只要不违背《兽医生物制品制造及检验规程》的原则，各厂都可形成自己的工艺，因此，本书没有具体把每个产品的制造工艺和方法一一罗列，在说到某个工艺方法时，只以其中一个产品的生产为例，这样编排便于读者举一反三，从中扩展到同类的其他产品的制造。

本书提到的很多做法，是编者在工作中的总结与体会，是个人的一孔之见，一定存在不足之处和错误的地方，恳请批评指正。

本书的编成得益于农基革先生的大力指导和帮助，在此深表谢忱！

编者

2007年1月

目 录

第一章 兽用生物制品	(1)
1 兽用生物制品 (Veterinary Bioproducts) 概述	(1)
2 兽用生物制品的分类	(2)
3 生物制品命名原则	(8)
4 动物预防用生物制品	(9)
5 动物预防用生物制品沿革	(16)
6 动物预防用生物制品生产工艺流程原则	(20)
第二章 兽药生产质量管理规范 (GMP)	(23)
1 兽药生产质量管理规范 (GMP) 的概念	(23)
2 我国实施兽药工业 GMP 的历程	(23)
3 兽医生物制品的生物安全	(25)
4 GMP 对兽药生产企业的基本要求	(28)
第三章 兽医生物制品的监察制度与《兽医生物制品 制造及检验规程》	(34)
1 《规程》的立规宗旨与依据	(34)
2 《规程》执行主体与授权行使监督的机关	(34)
3 监察室在行使监督中的双重职能	(35)
4 兽医生物制品厂的准入条件和必须遵循的原则	(36)
5 《规程》规定产成品的法定检验项目	(37)

6 《规程》赋予监察室菌(毒)种保管的职责与义务	(41)
7 防止散毒的措施	(41)
8 关于新兽医生物制品研发的规定	(43)
第四章 物品的杀菌、消毒与防腐	(46)
1 消毒药品及灭菌防腐的概念	(46)
2 应用化学消毒药剂应注意的问题	(49)
3 常用的消毒药剂	(50)
4 射线消毒灭菌	(66)
5 高压蒸汽灭菌	(70)
第五章 常用仪器的使用与器皿的洗涤	(77)
1 显微镜(普通光学显微镜)使用及保养	(77)
2 暗视野显微镜使用细则	(79)
3 显微镜摄影装置及显微镜摄影技术	(80)
4 25 型酸度计操作细则	(80)
5 电冰箱及其正确使用	(84)
6 电热水浴箱使用方法及注意事项	(85)
7 生产用器具的洗涤	(85)
第六章 实验微生物技术	(91)
1 细菌染色常用的染料	(91)
2 媒染剂和脱色剂	(92)
3 几种常用染色液的配制和染色方法	(92)
4 涂片染色程序及注意事项	(97)
5 实验室使用规则	(98)

第七章 主要生产设备使用与培养管道安装组合	(100)
1 细菌培养工装——生物反应器	(100)
2 冷冻真空干燥设备	(104)
3 细菌大瓶通气培养装置	(112)
4 菌液浓缩用管式离心机	(113)
5 乳化设备	(114)
6 以病毒为抗原的产品生产设备	(115)
7 培养管道的设计与组合	(118)
第八章 培养基制造	(122)
1 培养基的分类和主要成分	(122)
2 主要肉类原料的选择、保存及加工	(126)
3 肉类原料的煮沸及消化	(130)
4 培养基沉淀的去除	(131)
5 培养基分装	(132)
6 生物制品生产常用培养基的制造	(134)
7 培养基有效成分的测定	(141)
第九章 裂解血球全血和犍牛血清的制备	(145)
1 裂解血球全血的制备	(145)
2 犍牛血清的制备	(149)
第十章 氢氧化铝胶的合成与 20% 铝胶生理盐水的制备	(152)
1 氢氧化铝胶的合成原理	(152)
2 工艺流程	(153)
3 20% (V/V) 氢氧化铝胶生理盐水配制及检验	(156)

第十一章 生产用菌（毒）种与菌液培养	(158)
1 菌（毒）种的来源	(158)
2 菌（毒）种的特定标准	(158)
3 制苗用菌（毒）种弱毒株	(160)
4 细菌培养技术	(160)
第十二章 病毒培养增殖技术	(177)
1 病毒复制增殖机理	(177)
2 以动物体培养增殖病毒技术	(179)
3 用乳兔培养增殖病毒技术	(181)
4 大兔培养增殖病毒技术	(183)
5 鸡胚培养增殖病毒技术	(186)
第十三章 细胞苗生产技术	(191)
1 动物细胞及组织培养的概念	(191)
2 组织培养的方法与组培细胞的特性	(192)
3 细胞的分裂与繁殖	(194)
4 细胞培养技术在病毒研究和生物制品生产中的 应用	(196)
5 细胞“系”与细胞“株”	(197)
6 组织培养用各种溶液的配制	(200)
7 无菌犊牛血清的基础要求	(203)
8 细胞培养工装	(203)
9 原代单层细胞的制备与病毒培养增殖	(206)
10 用组培细胞测定病毒毒价的方法	(213)
11 细胞蚀斑测定	(214)

第十四章 配苗、分装与冻干	(217)
1 保护剂的概念	(217)
2 5% 蔗糖牛奶保护剂的配制	(217)
3 7% 明胶保护剂的配制	(218)
4 SPGA 液的配制	(218)
5 配苗	(219)
6 分装	(223)
7 入柜冻干	(223)
第十五章 油乳剂灭活疫苗和蜂胶佐剂疫苗制造	(226)
1 油乳剂灭活疫苗制造	(226)
2 蜂胶佐剂疫苗的制造	(230)
第十六章 抗病血清的制造	(235)
1 抗病血清 (antiserum)	(235)
2 制造高免血清用动物的选择	(236)
3 制造抗血清免疫抗原的制备	(237)
4 供血动物的免疫	(239)
第十七章 疫苗产品成品的检验	(244)
一、疫苗的效力检验	(244)
1 以病毒为抗原的疫苗产品成品的效力检验	(244)
2 以细菌为抗原疫苗产品的效力检验	(247)
二、疫苗的安全检验	(251)
1 以病毒为抗原的疫苗产品成品的安全检验	(252)
2 以细菌为抗原的疫苗产品成品的安全检验	(254)
三、疫苗的无菌或纯粹检验	(257)
1 以病毒为抗原的组织苗无菌或纯粹检验	(257)

2	灭活疫苗的无菌检验	(259)
3	细菌弱毒株活疫苗的纯粹检验	(259)
第十八章 生物制品使用的几个问题 (261)		
1	接种疫苗的保护性免疫问题	(261)
2	疫苗的性质与免疫原性	(262)
3	疫苗接种途径的选择	(264)
4	免疫接种的剂量	(266)
5	接种次数与时间间隔	(266)
6	佐剂与免疫力的关系	(268)
7	预防接种的异常反应	(269)
8	免疫程序与接种疫苗的免疫效果	(270)
9	慎用“自家苗”	(271)

第一章 兽医生物制品

1 兽医生物制品 (Veterinary Bioproducts) 概述

兽医生物制品是指以天然或者人工改造的微生物、寄生虫、生物毒素或者生物组织及代谢产物等为材料,采用生物学、分子生物学或者生物化学、生物工程等相应技术制成的,用于预防、治疗和诊断动物疫病或者改变动物生产性能的兽药。它包括疫苗(动物预防用生物制品),血液制剂(如抗病血清、血浆蛋白、免疫球蛋白等),抗菌素(如青霉素、链霉素、土霉素),传染病的特异性诊断制剂(各种诊断液),治疗制剂(如抗毒素和干扰素、白介素等副免疫制剂)。

早期的生物制品只包括以细菌为抗原的菌苗、以病毒为抗原的疫苗、类毒素及抗病血清,这些制品统称为“疫苗”。随着生物制品种类的不断增加,应用范围的不断扩大,才形成了“生物制品”这个专业的名词,并衍生了“生物制品学”这一专门的学科。以后又随着生物学、分子生物学以及生物化学的不断发展,生物制品的含义又进一步扩展,把包括所有应用生物学、分子生物学、生物化学等学科的原理及方法制成的、有免疫学反应的、能够产生平衡动物机体生理作用的药物制剂划归为生物制品。由于制造生物制品的抗原来源及制品的质量要求比较特殊,以后又把它与生化药物区别开来,其中免疫学、微生物学、预防兽医学是生物制品的理论基础。现代生物工程技术已成为生物制品及生化药物发展的方向,既把生物制品、生化药物二者紧密地联系起来,使之互相融合,互为渗透,但它又把具有自身特殊性

的生物制品与生化药二者严格地区别开来：一是生物制品制造的基础是微生物学。要懂得生物制品的制造与正确使用，首先要了解生物制品的本质，深谙各种抗原微生物的致病性、培养特征、致病机理，才可能制出有效、安全的疫苗；二是生物制品制造的理论基础是“免疫学”。动物预防用生物制品实际上是兽医免疫学制剂，是预防畜禽传染病、诊断畜禽传染病、治疗畜禽传染病（如抗病血清）的特殊的生物学药剂。传统的免疫学理念就是研究抗感染的一门专门学科，它们对机体免疫系统，尤其是在体液免疫、细胞免疫方面的研究，都与生物制品制造的理论与实践紧密相连，相互影响，互相促进。

2 兽医生物制品的分类

由于学术观点的不同，对生物制品的分类的方法，目前还尚未统一，但大多数人都主张按以下方法进行分类。

2.1 根据生物制品制造所用菌、毒、虫的种类，制造方法及其用途进行分类，生物制品分为：

2.1.1 疫苗 (Vaccine)。常称预防用生物制品（兽用疫苗则称动物预防用生物制品），指“用以注射接种动物后，能刺激动物机体产生免疫应答反应，获得主动免疫，达到预防某种相应传染病目的的这类生物药的统称，它包括以细菌为抗原的菌苗、以病毒为抗原的疫苗和以寄生虫为抗原的虫苗”，这一界定是科学的。但笔者认为仍不十分确切，改成为“由特定细菌、病毒、立克次体、螺旋体、支原体等微生物及寄生虫制成的主动免疫制品称疫苗”更准确，更符合目前我国有关法定的规定。

2.1.2 类毒素 (Toxoid)。又称为脱毒素，是细菌生长繁殖过程中产生的一种蛋白质和特殊的酶，属细菌的代谢产物，它随着细菌的繁殖而分泌到菌体外，毒性比较强，抗原性也强，不耐热，经化学药物处理后（如用甲醛脱毒），可以使其丧失毒力并

保留了原有的免疫原性（或毒素原性），注射接种动物后，能刺激动物机体产生主动免疫。如破伤风类毒素（简称破类）、白喉类毒素、肉毒素、肠毒素等。

2.1.3 诊断制剂（Diagnostic Preparation）。主要是用于动物疫病诊断、动物检疫、畜群健康监测及病原微生物的鉴定与分型。这类生物制品的种类很多，包括：凝集试验用抗原（如口蹄疫、猪瘟诊断用正向或反向间接血凝抗原等）与阴、阳性血清；补体结合试验用抗原与阴、阳性血清；沉淀试验用抗原（如炭疽沉淀反应抗原，亦称炭疽沉淀素血清，Ascoli 氏试验用）；琼脂扩散试验用抗原（如禽流感琼脂扩散试验抗原）与阴、阳性血清；标记抗原与标记抗体；定型血清与因子血清；致敏血球等。也有一些是用于体内试验的诊断制剂，如：马来因（鼻疽菌素）、牛提纯结核菌素（PPD）等，属变态反应抗原，通过细胞介导免疫，引起接种动物机体的迟发型变态反应，记录观察反应的程度（如注射接种部位注射接种前后的皮厚差及其他可见的临床表征）来确定动物是否感染了某种疫病。

随着分子生物学的进展，近年来又有不少新的诊断制剂推出，其中有的是经克隆化或经标记过的抗体、抗原，这类诊断制剂特异性和敏感性比常规诊断制剂大大提高，如：中国兽药监察所丘惠琛等研究推出的“猪瘟单克隆抗体”，用于猪瘟抗体的检测，可以区别是感染抗体还是免疫抗体；也有的把诊断制剂组装成诊断试剂盒，用于诊断动物疫病，既快速灵敏，又使用十分方便。如：兰州兽医研究所近年推出的“亚洲 1 型口蹄疫抗体液相阻断 ELISA 检测试剂盒”、上海优耐特生物药有限公司生产的“猪口蹄疫 VPI 结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验诊断试剂盒”及“鸡白痢诊断试剂盒”、广西兽医研究所研究推出的“鸡 IBD-ELISA 双抗夹心诊断试剂盒”等，有的还制成各种免疫金标诊断试剂，携带和保存十分方便。

2.1.4 抗病血清 (Antiserum)。抗病血清也称抗血清或高免血清。免疫学理论认为,动物机体的特异性免疫反应是动物机体受到抗原物质的刺激后,体内出现体液免疫(产生抗体)和细胞免疫(产生T淋巴细胞和淋巴细胞产物——淋巴因子)的过程。抗血清就是含有高效特异性的体液免疫抗体的动物血液制剂,在动物疫病的防控中,人们主要把它用于治疗 and 紧急预防相应病原微生物所引起的畜禽传染病,因此,也被称为被动免疫制剂。由于制造抗血清所用的动物不同,又有同源抗血清和异源抗血清之分。用本动物(病原微生物易感动物)制作的抗血清称同源抗血清,如“抗猪瘟血清”等;用非本动物(病原微生物非寄主或非易感动物)制作的抗血清称异源抗血清等。如:羊抗××血清,兔抗××血清等。

2.2 按照制品制造工艺方法和产成品的物理性状进行分类,生物制品又可分为:

2.2.1 普通的生物制品。普通的生物制品又称为常规制品,是指用一般经典的生产工艺方法生产制造的制品,当然也包括了那些必须经过适当处理才能成为制品的一些制剂产品(如猪丹毒氢氧化铝苗需要经过对菌液抽清作一定的浓缩,猪大肠杆菌病K88、K99、987P三价灭活苗要经过脱毒处理,才能成为疫苗)。但以有荚膜的细菌为抗原的生物制品,如多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗,它的抗原由菌体抗原和荚膜抗原两部分组成,而荚膜抗原是水溶性的,因此,出败类灭活疫苗一般不采用抽清浓缩,菌液培养结束,杀菌加铝即得原苗,只要其质量达到《兽医生物制品制造及检验规程》规定的各项标准即可。

2.2.2 精制的生物制品。精制与粗制只能相对而言,精制的生物制品是指用各种方法将普通制品(常规制品)进行提纯或提高抗原含量或除去原制品中的无效成分后的制品。这类生物制品免疫保护率高,特异性强,抗原性和免疫原性都好。如:猪

O 型口蹄疫浓缩苗。用猪 O 型口蹄疫常规苗免疫的猪只对强毒攻击的保护率低（只能保护 20 个对猪的最小感染量强毒的攻击），因而只适用于一般地区的防疫，而对疫区密集饲养猪群的抗感染效果相对要差一些。为了弥补这一不足，1992 年，兰州兽医研究所（现中农威特）在原有生产设备的基础上，采用抗原浓缩，增加抗原量的方法生产推出了“猪 O 型口蹄疫灭活疫苗”（浓缩苗）。“猪 O 型口蹄疫灭活疫苗”的技术核心是浓缩培养技术，即通过减少病毒培养液（维持液）的量，改变转瓶机的旋转速度等途径，来提高病毒的浓度，达到浓缩的目的。浓缩疫苗的效力（近期免疫保护）比普通疫苗的效力有了较大的提高。用体重 40kg 左右、经乳鼠中和试验测定无口蹄疫中和抗体的健康易感猪 15 头，分为 3 组，每组 5 头猪，分别于耳根后肌肉注射接种待检疫苗 1 头份，1/3 头份，1/9 头份 3 个不同剂量，接种后 15 日，连同条件相同的对照猪 2 头，每头耳根后肌肉注射攻击 200MLD 猪口蹄疫 O 型 ORMF8 株强毒，观察 10 天，对照猪应出现水疱病变，免疫猪出现任何口蹄疫症状判为不保护。根据免疫保护猪的多少，按 REED—MUENCH 法计算半数保护量，被检苗每头份至少应含 $3PD_{50}$ 。即能保护 200 个对猪最小感染量强毒的攻击，可见浓缩疫苗的效力比常规疫苗提高了近 10 倍；又如用于诊断牛结核的牛提纯结核菌素（PPD），是在原旧结核菌素生产工艺的基础上，将在制品进行过滤提纯，滤液用 40% 的三氯醋酸反复沉淀，每次沉淀物用 1mol/L 的氢氧化钠溶解，最后加入所需的磷酸盐缓冲液，调整 pH 值在 7.4，再用蔡氏滤器过滤即得 PPD 原液。旧结核菌素是常规制品，为全菌体灭活物，牛结核检验时，皮内注射接种剂量为 10 000 IU；而 PPD 是精制的制品，是纯菌体蛋白的衍生物，牛结核检验，皮内注射接种的剂量只需 2 000 IU。再如，黑一厂生产的新城疫 HA 抗原，是经过标定成为 4 个血凝价单位（1 个工作滴定单位）抗

原，可以直接使用于试验，减少了需先测定最高血凝价后再换算出工作滴度价的麻烦。

2.2.3 液状制品。在疫苗中则称湿苗。如中等毒力株鸡新城疫活疫苗（含毒鸡胚尿囊液），一般的灭活疫苗也大都是液状制品。各种灭活疫苗（各种油佐剂灭活苗和各种氢氧化铝胶苗）都是将强毒株的细菌、病毒作生产用种子，经培养增殖扩大后，将其灭活，再加入佐剂直接分装而制成（油佐剂苗则是以经灭活的菌液、毒液为水相，以等量的 10[#] 白油为油相，经乳化后而成）。液状制品至今仍是生物制品的主导产品，因为它保存、运输、使用方便，更适合于山区农村及冷链设施不健全的地方使用。但必须注意的是这类制品不耐高温，也不能冻结，一些以灭气菌为抗原的产品更不能让阳光直射，否则抗原降解，毒素增加，疫苗的安全性会下降。

2.2.4 干燥制品。常用冷冻真空干燥或喷雾干燥的方法使制品干燥。菌（毒）弱毒株疫苗都是制成冻干制品，并且冻干制品包装后也必须保持真空和干燥，其目的是使制品中的抗原（细菌、病毒）在不利的环境下（干燥、缺氧），处于停止新陈代谢的休眠状态，而延长自身的存活时间，达到延长有效保存期。干燥制品在使用时，也必须用稀释液将其变成液状才能注射接种动物，所以液状制品与干燥制品很难绝缘分开。

喷雾干燥在我国的出现比较晚，是 20 世纪 80 年代才推出的新工艺。大致做法是将培养结束后的菌液（灭活或不灭活），与保护剂混合，将其高压喷入干燥塔内，喷出的菌液在入塔之前，先经过 200℃ 以上高温的旋风分离器，使之在一瞬间脱水干燥，固形物因重力而落入塔内（见图 1-1）。将固形物（菌粉）收集、称重、分装即为干粉苗，如由中国兽药监察所研究推出的“羊厌气干粉苗”。由于在喷干过程中，产品是迅速脱水而干燥，抗原不受影响，速溶性能特别好。喷干过程，干燥的菌体会混入