

高职高专系列教材

GAOZHI GAOZHUAN
XILIE JIAOCAI

兽医生物制品 生产与检验

SHOUYI SHENGWU ZHIPIN SHENGCHAN YU JIANYAN

朱善元 主 编
王 涛 陆 辉 副主编

中国环境科学出版社

高职高专系列教材

兽医生物制品

生产与检验

SHOUYI SHENGWU ZHIPIN SHENGCHAN YU JIANYAN

江苏工业学院图书馆
藏书章

朱善元 主编
王书章 副主编

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

兽医生物制品生产与检验/朱善元主编. —北京: 中国环境科学出版社, 2006.8

(高职高专系列教材)

ISBN 7-80209-321-X

I. 兽… II. 朱… III. 兽医学—生物制品—高等学校: 技术学校—教材 IV. S859.79

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 107784 号

责任编辑 张玉海 任海燕

封面设计 陆 臻

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.cn>
联系电话: 010-67112765 (总编室)
发行热线: 010-67125803

印 刷 北京东海印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2006 年 8 月第一版
印 次 2006 年 8 月第一次印刷
印 数 1—3 000
开 本 787×960 1/16
印 张 17
字 数 330 千字
定 价 22.00 元

【版权所有。未经许可请勿翻印、转载, 侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

高 职 高 专 系 列 教 材
审 读 委 员 会

江苏食品职业技术学院	贡汉坤
杨凌职业技术学院	陈登文 陈淑茗
黑龙江农业经济职业学院	杜广平 张季中
苏州农业职业技术学院	潘文明 夏 红
吉林农业科技学院	孙艳梅
扬州大学兽医学院	秦爱建
复旦大学生命科学学院	黄伟达
中国农业大学实验动物中心	张 冰
中国绿色食品发展中心	张志华
国家环保总局有机食品发展中心	周泽江
江苏省兽药监察所	王苏华
江苏省农业科学院兽医研究所	戴鼎震

高 职 高 专 系 列 教 材
编 写 委 员 会

北京农业职业学院

赵晨霞 李玉冰 王晓梅 周珍辉

江苏畜牧兽医职业技术学院

葛竹兴 刘 靖 曹 斌 高勤学 朱善元

锦州医学院畜牧兽医学院

曲祖乙 王玉田

黑龙江生物科技职业学院

王 鹏 蔡长霞 马贵民

广西农业职业技术学院

杨昌鹏

杨凌职业技术学院

马文哲

江西生物科技职业学院

徐光龙

上海农林职业技术学院

张 江

前 言

兽医生物制品生产与检验是一门突出生物制品的生产技术及其应用的学科,在动物传染性疫病的预防和控制方面具有极其重要的作用。随着生物化学、分子生物学、免疫学的发展,生物制品的种类越来越多,生产技术水平也越来越高,应用范围也越来越广泛。因而,近年来,许多高等农牧职业院校的畜牧兽医、动物医学、动物养殖与疾病防治、畜牧生物技术、生物工程、动物药品生产与检验等专业相继开设了《兽医生物制品生产与检验》课程。

为了适应畜牧业集约化、规模化发展的需要,提高常用兽医生物制品的质量,做到安全高效,并促进新技术的应用和新产品的开发,我们编写了《兽医生物制品生产与检验》一书。本书理论与实践并重,既可作为高等农牧职业院校相关专业学生的教材,也可作为从事兽医生物制品研究和应用等领域工作者的参考资料。

本书由江苏畜牧兽医职业技术学院朱善元任主编,王涛、陆辉任副主编,参加编写的人员有谢静、刘玉华和黄银云。在本书编写过程中,力求保证其科学性、系统性、先进性及时效性。在注重实用的前提下,注意收集新知识、新技术,由于时间仓促,加之近年来该学科发展速度较快和作者水平有限,书中错误和不妥之处在所难免,恳请广大读者批评指正,以便再版时修正。

编 者

2006年7月

目 录

第一章 兽医生物制品的免疫学基础.....	1
第一节 免疫应答	1
一、体液免疫应答	2
二、细胞免疫应答	3
三、免疫耐受	4
四、免疫应答的机制	4
五、动物早期(胚胎)免疫应答.....	5
第二节 免疫血清学技术	8
一、概述	8
二、血球凝集与血球凝集抑制试验	8
三、琼脂免疫扩散试验.....	10
四、直接凝集试验	12
五、间接血球凝集试验.....	13
六、补体结合试验	15
七、病毒中和试验	16
八、其他检测技术	19
复习思考题	23
第二章 兽医生物制品概述	24
第一节 兽医生物制品的概念、分类与命名	24
一、兽医生物制品的概念	24
二、兽医生物制品的分类.....	25
三、兽医生物制品的命名.....	28
第二节 兽医生物制品的研究方法和发展方向	29
一、传统疫苗	29

二、基因工程亚单位苗	30
三、基因工程活载体苗	32
四、基因缺失苗	33
五、合成肽苗	33
六、抗独特型疫苗	34
七、副免疫及其制品	34
复习思考题	35
 第三章 兽医生物制品生产的基本技术	36
第一节 菌种与毒种选育技术	37
一、菌(毒)种的概念与分类	37
二、菌(毒)种的一般要求	38
三、菌(毒)种的鉴定	39
四、菌(毒)种的保存	40
五、菌(毒)种的选育	40
第二节 细菌培养技术	44
一、细菌的生长条件与繁殖规律	44
二、细菌培养的基本技术	47
三、培养基	52
第三节 病毒增殖技术	56
一、病毒的复制周期	56
二、病毒增殖的基本技术	58
第四节 实验动物与动物实验技术	68
一、实验动物概述	68
二、实验动物的饲养管理	71
三、动物实验技术	75
复习思考题	80
 第四章 兽医生物制品的灭活剂、佐剂及保护剂	81
第一节 灭活与灭活剂	81
一、灭活及灭活剂的概念	81
二、灭活的类型	82

三、常用灭活剂	82
四、影响灭活作用的因素	85
第二节 佐 剂	88
一、佐剂的概念	88
二、佐剂标准	88
三、佐剂的作用机理	89
四、佐剂类型	90
五、兽医上使用的佐剂	93
第三节 保护剂	100
一、保护剂的组成、作用机理与效应	101
二、保护剂种类	102
三、影响冻干保护剂效能的因素	102
四、常用的冻干保护剂	103
复习思考题	105
 第五章 兽医生物制品制造基本程序	106
第一节 疫苗制造	106
一、细菌性灭活疫苗制造	106
二、细菌性活疫苗制造	108
三、病毒性动物组织疫苗制造	109
四、病毒性禽胚培养疫苗制造	111
五、病毒性细胞培养疫苗制造	112
第二节 类毒素制造	114
第三节 免疫血清制造	117
一、免疫血清的概念	117
二、动物的选择与管理	118
三、免疫原	119
四、免疫程序及制定的原则	119
五、血液采集与血清的提取	120
六、几种重要畜禽用免疫血清、卵黄抗体的制备方法	121
七、免疫血清及卵黄抗体使用注意事项	122
第四节 诊断制剂制造	123

一、诊断抗原	123
二、诊断血清	126
三、标记抗体	126
四、单克隆抗体	128
复习思考题	131
第六章 冷冻真空干燥技术	132
第一节 概 述	132
一、冷冻真空干燥的原理与特点	132
二、冷冻真空干燥技术的应用	133
第二节 冻干机组与冻干程序	133
一、冻干机组	133
二、冻干程序	135
复习思考题	141
第七章 兽医生物制品质量控制	142
第一节 制造生物制品的条件	143
一、制造生物制品的基本条件	143
二、兽医生物制品生产的申报与审批	152
第二节 我国兽医生物制品监察制度	156
一、菌种与毒种管理	156
二、防止散毒的原则与措施	157
三、新制品管理	157
四、进出口制品管理	157
第三节 兽医生物制品质量检验程序及方法	158
一、抽样	158
二、无菌检验或纯粹检验	158
三、安全检验	160
四、效力检验	162
五、物理性状检验	164
六、真空度检查	165
七、残余水分测定	165

第四节 兽医生物制品的生物安全.....	165
一、生物安全的含义	166
二、我国兽用生物制品生物安全性问题.....	166
三、加强兽用生物制品生物安全管理的措施.....	168
复习思考题	169
 第八章 兽医生物制品的使用	170
第一节 兽医生物制品的运输与保存.....	170
一、运输	170
二、保存	170
第二节 疫苗的使用	171
一、免疫接种形式	171
二、免疫接种途径	172
三、母源抗体与免疫程序.....	177
四、免疫失败的原因及控制.....	179
复习思考题	184
 附录	185
附录一 兽药生产质量管理规范.....	185
附录二 兽药管理条例	206
附录三 兽药注册分类和注册要求.....	218
附录四 病原微生物实验室生物安全管理条例	234
附录五 动物病原微生物分类名录.....	247
附录六 高致病性动物病原微生物实验室生物安全管理审批办法	249
附录七 兽药注册办法	254
 参考文献	260

第一章 兽医生物制品的免疫学基础

【知识目标】

- 熟悉免疫学诊断与检测的常用技术;
- 理解免疫耐受及免疫应答的机制;
- 掌握体液免疫应答和细胞免疫应答;
- 了解动物早期(胚胎)免疫应答机理。

【能力目标】

- 能进行血球凝集(HA)与血球凝集抑制(HI)试验、琼脂免疫扩散试验、补体结合试验、病毒中和(VN)试验等操作;
- 能应用免疫荧光抗体技术、酶联免疫吸附试验(ELISA)、单克隆抗体技术、PCR技术等进行免疫检测。

兽医生物制品即动物免疫学制品,是动物传染病的特异性免疫预防、免疫诊断和免疫治疗制剂,而免疫学的传统概念就是研究抗传染免疫的一门学科,因此说免疫学是生物制品的理论基础。

兽医生物制品主要是从细菌、病毒、寄生虫及其组成成分或代谢产物本身,或从免疫的动物机体所得到的抗体制剂。因此,要了解、掌握生物制品的研究与使用方法,必须了解免疫学的一般知识。

第一节 免疫应答

免疫应答是动物机体免疫系统识别各类异物,并将其杀死、降解和排除的过程。其中包括体液免疫应答和细胞免疫应答两方面。

一、体液免疫应答

当巴斯德发现用疫苗接种可以预防某些家畜、家禽的传染病后，不久便弄清了提供这种抵抗力的物质存在于血清之中，并证明，应用接种过疫苗的动物血清可以将这种抵抗力被动地传递给未接种的动物。如用经过疫苗接种而对破伤风毒素产生了抵抗力的马血清，再以适当剂量注射给正常马，可产生暂时的抵抗力。这种从免疫马采集的血清称为破伤风抗毒素血清，广泛应用于破伤风的预防和治疗。这种血清中存在的抗病因子称为抗体。因此抗体是介导体液免疫效应的免疫分子。在正常马血清中是没有这种抗体的，只有经过疫苗注射的马才产生这种抗体，而刺激马产生抗体的物质称为抗原。抗体只能与相应的抗原结合产生免疫反应，其结果是被中和了的抗原失去致病力，从而使动物获得抵抗力。

动物机体初次和再次接触抗原后，引起体内抗体产生的种类、抗体水平等均有差异（图 1-1）。从未接种过抗原的动物，第一次注射抗原（破伤风类毒素或其他抗原物质）以后，在数日之内检查不出反应，这叫做延缓期。约在第一次注射后 1 周左右，开始从血清中检查到抗体，并在第 10~14 d 上升到最高水平，以后又迅速下降。一般来说，初次应答期间，所产生的抗体数量以及提供的保护作用，都是较小（少）的。但如果是在第一次接种后经一定时间，对同一动物实施第二次抗原注射，并再次研究其所产生的抗体数量时，其延缓期不超过 2~3 d，然后其抗体数量就迅速上升到很高水平，持续一定时间后开始缓慢下降。如果给同一动物实施第三次抗原注射，那么就会形成一个更短的延缓期和更高、更持久的抗体免疫应答。这种通过多次注射抗原刺激来提高抵抗力的方法，构成了通用的预防传染病的疫苗接种技术的基础。

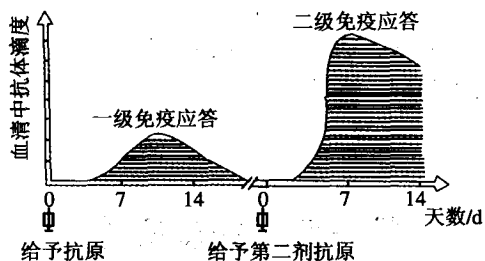


图 1-1 用血清抗体含量测定对抗原免疫应答过程

实践证明，动物对第二次抗原的应答与第一次应答是大不相同的，其效果比第一次快而强烈得多。这种再次的应答是有特异性的，它只能由与第一次相同的抗原所引起。而再次免疫应答常发生在第一次注射抗原数月或数年之后，其反应的强烈程度随时间的

流逝而逐渐减弱。而且即使动物对第一次抗原注射的应答微弱到不能测出的程度，也仍然可激发起再次的应答。这说明抗体形成的细胞对已接触过的抗原具有“记忆能力”。所以还应当注意，反复注射抗原并不一定能使免疫应答无限地扩大，血清抗体总水平保持良好，所以，即便是多给予抗原或接触许多不同抗原，动物血清中的抗体仍然保持相对稳定和常态平衡。

二、细胞免疫应答

如果将皮肤移植物从一个供体移植给与供体无关的另一个同类受体动物，该移植物大约只能存活 10 d 左右。开始时移植物表现健康，而且在移植物与宿主之间会建立起血管联系。但大约在 1 周左右的时间里，这些新生的血管会发生变性，终止了对移植物的血液供应，最后移植物发生死亡并脱落。这种缓慢的排异过程称为“第一次应答”（图 1-2）。如果再从原来的供体采取第二个移植物，再将其移植到同一个受体上，第二个移植物存活不超过 1~2 d 就会被排斥掉。这种快速的排斥过程称为“第二次应答”。这样，我们看到在移植物的排斥过程中，动物对第一个移植物的应答和一级抗体应答相似，是较微弱和缓慢的，而第二个移植物则引起快速而有力的第二次反应，在众多方面也与二级抗体应答相类似。移植物排斥和抗体生成同样具有特异性，只是当第二个移植物与第一个移植物都是来自同一供体时，才会发生第二次反应，最后与抗体生成一样，移植物的排斥过程也具有“记忆能力”。所以在第一个移植物脱落后的许多年里，第二个移植物仍可以被迅速排斥掉。

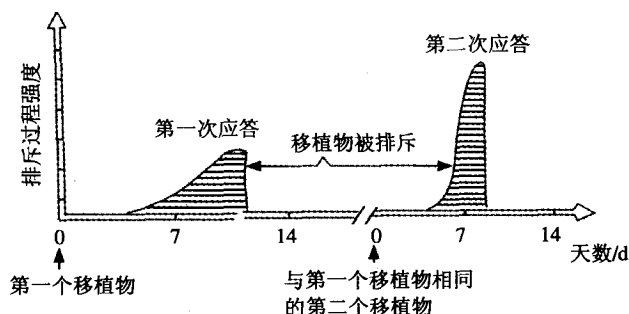


图 1-2 对异体皮肤移植物的免疫应答过程

然而，移植物的排斥过程与抗毒素的保护作用并不完全相同，因为前者不能用血清抗体从致敏动物传递给正常动物对移植物发生第二次反应，只能用活细胞从一个动物传递给另一个动物。可执行这种传递作用的细胞，通常是脾、淋巴结及外周血液中的 T 淋巴细胞，而不是血清抗体。

三、免疫耐受

免疫系统能将外源性抗原（微生物性抗原和异体移植物）识别为异物，这对免疫系统来说是非常重要的。那么我们必然会推论出，免疫系统还必须能识别本身的细胞抗原为“非异物”，所以不去发动对其免疫应答。也就是说，免疫系统必须“耐受”其自身的抗原。如果这种耐受性遭到破坏，抗体或淋巴细胞就会去消灭这种抗原，同时破坏自身的细胞，引起自身免疫性疾病。在细胞或抗体免疫系统中都存在着耐受性，而且可以认为耐受性是另外一种正常的免疫应答形式。如可以给动物以适当剂量的抗原去引发耐受性，其表现就是对特异性抗原无应答力，和其他形式的免疫应答一样，耐受对引发其产生的抗原也是有特异性的，而且只能因再次接触同一抗原而加强。如果不能再次接触同一抗原，那么免疫耐受性就会逐渐消失。

综上所述，免疫应答是抗体与细胞的免疫应答和免疫耐受性。动物机体应有自身监视和抵抗入侵微生物的免疫系统。可以认为，细胞免疫应答是免疫监视功能的反应，而抗体免疫应答则是预防功能的反应。然而，这样的区分并不是绝对的，因为抗体的存在有助于移植物的排斥，而细胞免疫应答也参与抗体防御各种传染病。至于耐受性则代表着另一种必不可少的保护机制，它能保护动物免遭免疫应答不加选择的伤害作用。

四、免疫应答的机制

可以将动物机体的免疫系统比作成一个集权的国家，在这个国家里，对入侵者加以消灭，对自己的合法公民包容，而“越轨”者则被消除。当然这种比拟是有限的，但显然这种社会制度有许多独特之处，是可以与一个动物体的免疫系统相对比的。

同样，当抗原性物质入侵机体之后，它首先被识别为外源性的并被捕获。然后这种信息被传递到抗体生成系统或细胞免疫系统，随后这些系统开始发生反应，产生特异性抗体或致敏性淋巴细胞去消灭侵入的抗原。免疫系统还可以将这种信息“记忆”储存起来，以便以后再遇到同一抗原时作出更有效的反应。所以，可认为免疫系统包括以下的基本构成：捕捉与处理抗原的系统（图 1-3）；与抗原发生特异性反应的机构——抗原敏感细胞；产生抗体及参与细胞免疫的细胞；保持对信息的“记忆”并在将来的遭遇中与抗原发生特异性反应的细胞；以及最终消灭抗原的细胞。捕捉、处理与最终消灭抗原的细胞是巨噬细胞；无论是初次应答开始时的抗原敏感细胞，还是发动再次应答的记忆细胞之类的抗原敏感细胞，以及细胞免疫应答的效应细胞，都是小淋巴细胞；而抗体生成细胞是浆细胞。

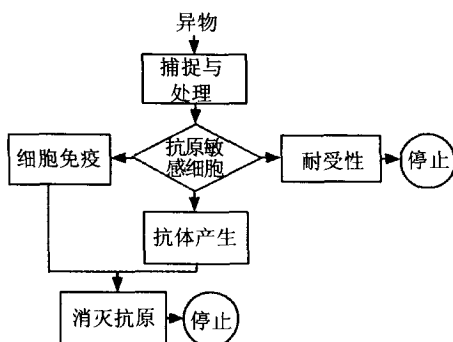


图 1-3 捕捉与处理抗原的系统流程

五、动物早期（胚胎）免疫应答

胚胎对抗原的应答能力在淋巴样器官出现以后很快就形成了。但各种抗原刺激胎儿淋巴样组织的能力有所不同，并不是对所有抗原都能产生应答。已证明，随着胎儿的发育，能引起其形成的抗体也逐渐增多。发动细胞免疫应答的能力大约在抗体生成的同时形成。

（一）常见动物免疫系统的个体发生

1. 犊牛

犊牛的免疫系统在胚胎早期即已形成。虽然母牛的妊娠期是 280 d，但胎儿的胸腺在受胎后 40 d 即可出现。骨髓和脾脏在 55 d 时出现，淋巴结在 60 d 可以见到，但 peyer 氏淋巴集结要到 75 d 才出现。因为淋巴集结的发生较晚，说明它们可能不是一级淋巴样组织，所以不能将它们看作是相当于禽类的法氏囊器官。在胎犊 45 日龄时可见到外周血液淋巴细胞，59 d 可见到带 IgM 的细胞，135 d 时可见到 IgG 的细胞出现。血清抗体的检出最早时间，依赖于所用方法的灵敏程度。所以应用极其敏感的病毒中和试验，一定能最早检出针对病毒的免疫应答。

2. 羔羊

母羊的妊娠期为 145 d，胸腺和淋巴结分别于受胎后 35 d 和 50 d 可以认出，但 peyer 氏淋巴集结到 80~90 d 才出现。外周血液淋巴细胞可见于 35 日龄的胎羊。在第 41 d 它们能产生对 Φ X174 噬菌体的抗体；77 d 时可排斥不同种皮肤移植物；90 d 时能对 SV40 病毒产生抗体；105 d 时能产生抗 T4 噬菌体抗体；122 d 时可产生抗蓝舌病毒抗体；140 d 时产生抗淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒抗体。

3. 仔猪

母猪妊娠期为 114 d, 胎猪的胸腺在 40 d 时形成。胎猪在 42 d 时可产生对细小病毒的抗体, 与此同时能排斥同种移植物。血液循环中带 Is 的细胞在 70 d 和 80 d 之间急剧增加。胎猪对抗原的应答主要是 IgM 型抗体。但新生仔猪和胎猪还生成一种没有轻链的 4S 免疫球蛋白。

4. 仔狗

母狗的妊娠期为 60 d, 在受胎后 20 d 前后胎狗胸腺分化。胎狗在 40 d 时对噬菌体 Φ X174 产生应答。外周血液淋巴细胞在受胎的 45 d 对植物凝集素产生应答。在 45~50 d 前后可在淋巴结中检出淋巴细胞, 在脾脏中是 50~55 d。在 45 d 前后还形成了排斥同种移植物的能力, 但排斥过程较为缓慢。在 42 d 以前, 子宫内注射抗原可使仔狗获得耐受性。所以, 狗的胸腺 T 细胞植入二级淋巴器官以及体液免疫应答能力的形成与其他家畜相比似乎较迟。

5. 雏鸡

在孵化后 5~7 d, 卵黄膜中的 T 细胞出现, 并在趋化性的影响下迁移到胸腺和法氏囊。这些细胞在法氏囊中分化, 并于孵化后第 12 d, 在囊中形成滤泡。在 14 d, 在法氏囊中可以查到带有 IgM 表面膜标志的淋巴细胞, 这种 IgM 的表面膜标志能结合抗原。孵化后第 16 d 和第 18 d, 可以分别产生抗钥孔血蓝蛋白的抗体和抗绵羊红细胞抗体。在第 21 d 出壳前后, 形成带有表面膜标志 IgG 的淋巴细胞。而 IgA 阳性细胞在出生后 3~7 d 才首次出现于肠中。

(二) 新生动物的免疫应答

新生动物基本上是在无菌的子宫环境中发育的, 当降生到存在很多抗原的环境时, 新生动物能充分地产生免疫应答能力。但是新生动物产生的任何一种免疫应答毕竟还是一级应答, 其延续期长, 所产生的抗体也是低浓度的。所以, 如果不为其提供“免疫学的帮助”, 新生动物就容易死于微生物感染, 而这些微生物对成年动物却危害不大。这种“免疫学的帮助”就是通过初乳或卵黄从母体获得抗体, 建立起被动性免疫。已知母体的淋巴样细胞也可以通过胎盘转移到胎儿的淋巴样组织, 或通过初乳经肠输送给新生动物, 但这种转移的生物学意义尚不明确。

母体抗体到达胎儿的途径取决于胎盘屏障的性质。人和其他灵长类动物的胎盘是绒毛膜性的, 也就是母体血液直接和滋养层相接触。这种类型的胎盘允许 IgG 通过, 而不允许 IgM、IgA 和 IgE 转移到胎儿。母体的 IgG 可以经胎盘进入胎儿的血液循环, 所以从母乳获得少量 IgG (5%~10%), 但大部分是从母体中获取。

反刍动物的胎盘是结缔绒毛膜性的, 即绒毛膜上皮直接与子宫组织相接触。而马与猫的胎盘是上皮绒毛膜性的, 胎儿绒毛膜上皮和完整的子宫上皮相接触。具有这两种胎盘的