

· 技术方法 ·

维氏气单胞菌 CA07 株灭活疫苗生产工艺的优化

孙承文¹, 巩华^{1,2}, 赖迎迢^{1,2}, 江小燕¹, 任燕^{1,2}, 陈总会¹, 黄志斌^{1,2}, 陶家发^{1,2}

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东广州 510380;

2. 农业部渔药创制重点实验室 广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东广州 510380

摘要: 目的 优化维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*, AV)CA07 株灭活疫苗的生产工艺。方法 通过对 AV CA07 株菌种培养时间(2~16 h)、发酵培养基(优化发酵培养基、LB 培养基、NB 培养基)、发酵条件[接种量(1%、5%、10%、15%)、通气量(2、4、6、8 L/min)、发酵时间(6、8、10、12 h)]的优化, 确定 AV CA07 株菌液的发酵工艺。通过对灭活剂甲醛溶液的终浓度(0.10%、0.20%、0.30%、0.40%)、灭活温度(28 和 37 °C)、灭活时间(24、48、72 h)的比较, 确定最佳灭活工艺。建立 AV CA07 株灭活疫苗 500 L 发酵罐规模化生产工艺, 并对制备的疫苗进行安全性及免疫原性试验。结果 AV CA07 株发酵工艺的最佳接种量为 5%, 通气量为 4 L/min, 培养时间为 10~12 h; 最佳灭活条件为: 用终浓度 0.30% 的甲醛溶液于 37 °C 灭活 24 h。500 L 发酵罐制备的 AV CA07 株菌液活菌数达 8×10^9 CFU/mL 以上, 灭活后经腹部免疫鲫鱼, 鲫鱼全部存活; 攻毒后, 相对免疫保护率达 90% 以上。结论 采用优化生产工艺制备的 AV CA07 株灭活疫苗具有良好的安全性及免疫原性。

关键词: 维氏气单胞菌; 灭活疫苗; 生产工艺; 安全性; 免疫原性

中图分类号: S917.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)01-0076-06

Optimization of production process of *Aeromonas veronii* CA07 strain inactivated vaccine

SUN Cheng-wen, GONG Hua, LAI Ying-tiao, JIANG Xiao-yan, REN Yan, CHEN Zong-hui,

HUANG Zhi-bin, TAO Jia-fa

River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380, Guangdong Province, China

Corresponding author: TAO Jia-fa, E-mail: taojiafa6418@163.com

Abstract: Objective To optimize the production process of inactivated vaccine of *Aeromonas veronii* (AV) CA07 strain. **Methods** The fermentation culture process of AV CA07 strain liquid was determined through the optimization of the culture time (2~16 h), medium (optimized fermentation medium, LB medium and NB medium) and fermentation conditions (inoculation amount of 1%, 5%, 10% and 15%; ventilation rate of 2, 4, 6 and 8 L/min and fermentation time of 6, 8, 10 and 12 h). The optimal inactivation process was determined through the comparison of the final concentration of formaldehyde solution (0.10%, 0.20%, 0.30% and 0.40%), inactivation temperature (28 and 37 °C) and inactivation time (24, 48 and 72 h). The large-scale production process of inactivated vaccine of AV CA07 strain in 500 L fermentor was established and the prepared vaccines were tested for safety and immunogenicity. **Results** The optimal inoculation amount of AV CA07 strain was 5%, ventilation rate was 4 L/min and culture time was 10~12 h. The optimal inactivation condition was adding formaldehyde solution with final concentration of 0.30% incubating at 37 °C for 24 h. The number of viable bacteria in the fermentation broth of AV CA07 strain prepared in 500 L fermentor was more than 8×10^9 CFU/mL. All crucian carps immunized with the inactivated vaccine by abdomen survived. After challenge, the relative immune protection rate was more than 90%. **Conclusion** AV CA07 strain inactivated vaccine prepared by optimized production process showed good safety and immunogenicity.

Keywords: *Aeromonas veronii* (AV); Inactivated vaccine; Production process; Safety; Immunogenicity

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900103); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项资金(2020XT0405); 广州市科技计划项目(201904020004).

通信作者: 陶家发, E-mail: taojiafa6418@163.com

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*, AV)属于弧菌科(*Vibrionaceae*)气单胞菌属(*Aeromonas*),广泛分布于水体环境中,是一种新型人-兽-鱼共感染的致病菌,该菌可感染多种鱼类,发病鱼类表现为腹水及鳍条基部、眼眶、体表部位充血等症状,该病流行区域广泛,危害严重,给水产养殖业造成了严重的经济损失^[1-7]。目前,对该菌感染的防控还是以见效快、疗效好的抗菌素类药物为主,但随着抗菌素的大量使用,AV的耐药性特别是多重耐药性日益严重,出现了大量耐药菌株^[8],因此开发AV相关疫苗对预防该病具有重要意义。

目前,已有多家科研单位研发了AV灭活疫苗,且具有良好的免疫效果^[9-10],但尚未见该疫苗的产业化生产研究及应用的相关报道。因此,本研究对AV CA07株灭活疫苗规模化生产工艺进行优化,以期制备高质量的AV灭活疫苗,为其产业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株 AV CA07株由中国水产科学研究院珠江市场研究所分离鉴定及保存。

1.2 实验动物 健康鲫鱼购自佛山市三水白金水产种苗有限公司,体质量为12~16 g。

1.3 主要试剂及仪器 胰蛋白胨及牛肉膏购自广东环凯生物科技有限公司;葡萄糖、硫酸镁、氯化钠、磷酸二氢钾及甲醛溶液购自广州化学试剂厂;50 L种子罐及500 L发酵罐购自福州福尔流体设备有限公司;7 L自动发酵罐购自广东齐志生物科技有限公司;紫外分光光度计购自上海奥析生物科技有限公司。

1.4 培养基的配制 优化发酵培养基:胰蛋白胨10.0 g/L、牛肉膏5.0 g/L、葡萄糖5.0 g/L、硫酸镁0.4 g/L、磷酸二氢钾2.0 g/L及氯化钠5.0 g/L;LB培养基:酵母提取物5 g/L、蛋白胨10 g/L及NaCl 5 g/L;NB培养基:蛋白胨1.0 g/L、牛肉浸出粉5.0 g/L、酵母浸出粉2.0 g/L及氯化钠5.0 g/L;营养琼脂培养基:18 g/L琼脂粉。均经121 °C高压灭菌。

1.5 AV CA07株灭活疫苗生产工艺的优化

1.5.1 种子液培养时间的确定 取冻存AV CA07株菌种,加入少许NB培养基溶解,将100 μ L菌液接种于营养琼脂培养基,28 °C培养24 h;挑选单菌落,接种于营养琼脂培养基,继续培养24 h;挑取菌落,接种至NB培养基,28 °C,150 r/min振荡培养制备种子液,每2 h取样1次,至 A_{600} 不再升高,以培养时间为横坐标, A_{600} 为纵坐标,绘制生长曲线,每个时间点重复检测3次。以 A_{600} 最高时的时间为最佳培养时间,并于该时间进行活菌计数。

1.5.2 发酵培养基的确定 用7 L发酵罐分别配制不同培养基(优化发酵培养基、LB培养基、NB培养基),将AV CA07株种子液分别按1%的接种量接种,于28 °C,通气量2 L/min,200 r/min振动培养12 h;收获菌液,进行活菌计数。

1.5.3 发酵条件的确定

1.5.3.1 接种量 选用1.5.2项确定的最佳培养基,按不同接种量(1%、5%、10%、15%)接种AV CA07株种子液,于28 °C,通气量4 L/min条件下培养12 h,收获菌液,进行活菌计数。

1.5.3.2 通气量 选用1.5.2项确定的最佳培养基,按5%的接种量接种AV CA07株种子液,通气量分别设为2、4、6、8 L/min,于28 °C发酵培养12 h,收获菌液,进行活菌计数。

1.5.3.3 发酵时间 选用1.5.2项确定的最佳培养基,按5%的接种量接种AV CA07株种子液,于28 °C,通气量4 L/min条件下分别发酵6、8、10、12 h,收获菌液,进行活菌计数。

1.5.4 灭活条件的确定 选用1.5.2项确定的最佳培养基,按5%的接种量接种AV CA07株种子液,于28 °C,通气量6 L/min条件下发酵培养12 h,收集菌液,分装三角瓶,200 mL/瓶。依次加入甲醛溶液至终浓度为0.10%、0.20%、0.30%、0.40%,分别于28和37 °C,80 r/min摇床灭活24、48、72 h,取菌液1 mL,接种营养琼脂培养基,检测灭活效果。每种条件下的样品重复检测3次。

1.6 AV CA07株灭活疫苗规模化生产工艺的建立 配制300 L优化发酵培养基,分别加入50 L种子罐(30 L)和500 L发酵罐(270 L),按培养基体积的0.02%加入消泡剂,121 °C高压灭菌20 min,待培养基温度降至约28 °C,以5%接种量将种子液接种于50 L种子罐,罐压0.05 MPa,通气量40 L/min,转速200 r/min,28 °C培养12 h;将50 L种子罐培养液接种至500 L发酵罐,罐压0.05 MPa,通气量180 L/min,转速200 r/min,28 °C培养12 h。均每2 h取样1次,检测 A_{600} ;于培养12 h时进行活菌计数。发酵菌液转入灭活罐,加入甲醛溶液终浓度为0.30%,37 °C,80 r/min搅拌灭活24 h,取菌液1 mL,接种于营养琼脂培养基,检测灭活效果。共制备3批。

1.7 安全性试验 取健康鲫鱼120尾,置27~29 °C温度的水环境中适应饲养7 d以上,确认健活后,将鱼随机分为4组,每组30尾。3个疫苗免疫组经鱼腹腔分别注射1.6项制备的3批AV CA07株发酵菌液,0.4 mL/尾;对照组经鱼腹腔注射等体积的0.9%氯化钠溶液。连续观察14 d,每日记录各组鱼的死亡情况。

1.8 免疫原性试验 按 1.7 项方法对鲫鱼进行饲养及分组,免疫剂量为 0.2 mL/尾。免疫 28 d 后,疫苗免疫组和对照组均经鱼腹腔注射 AV CA07 株菌液(活菌数 3.5×10^7 CFU/mL),0.1 mL/尾,攻毒后连续观察 7 d,每日记录各组鱼的死亡情况,并按下式计算疫苗的相对免疫保护率。

$$\text{相对免疫保护率}(\%) = (1 - \text{疫苗免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

2 结果

2.1 AV CA07 株灭活疫苗生产工艺的最佳条件

2.1.1 最佳种子液培养时间 种子液培养 12~14 h 时, A_{600} 达高峰,菌液浊度最大;随后 A_{600} 开始下降,见图 1。表明 AV CA07 株种子液培养时间以 12~14 h 为佳,14 h 活菌数为 3.45×10^9 CFU/mL。

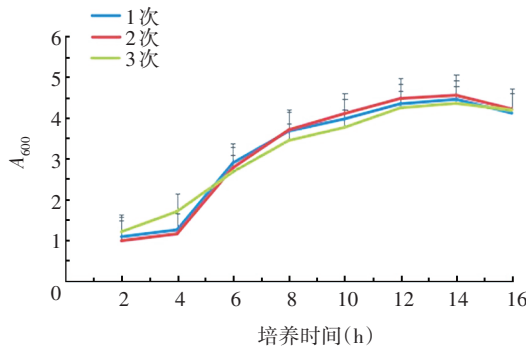


图 1 AV CA07 株种子液的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of AV CA07 strain liquid

2.1.2 最佳培养基 优化发酵培养基、LB 培养基、NB 培养基培养 AV CA07 株菌液活菌数分别为 6.4×10^9 、 4.6×10^9 、 5.3×10^9 CFU/mL,优化发酵培养基的活菌数最高,因此确定该培养基为最佳培养基。

2.1.3 最佳发酵条件

2.1.3.1 接种量 按 1%、5%、10%、15% 接种量接种 AV CA07 株菌液的活菌数分别为 6.2×10^9 、 7.6×10^9 、 7.1×10^9 、 6.9×10^9 CFU/mL,接种量为 5% 时,菌液活菌数最高,随后有所下降。因此确定 5% 为最佳接种量。

2.1.3.2 通气量 2、4、6、8 L/min 通气量 AV CA07 株菌液的活菌数分别 6.3×10^9 、 8.7×10^9 、 9.0×10^9 、 8.1×10^9 CFU/mL,通气量为 6 L/min 时,活菌数最高,因此确定 6 L/min 为最佳通气量。

2.1.3.3 发酵时间 发酵 6、8、10、12 h 时 AV CA07 株菌液的活菌数分别 4.4×10^9 、 7.1×10^9 、 8.8×10^9 、 8.5×10^9 CFU/mL,10 h 达最大,10~12 h 较稳定,

因此确定 10~12 h 为最佳发酵时间。

2.1.4 最佳灭活条件 28 °C 条件下,当甲醛溶液终浓度为 0.30% 时,灭活 48 h,菌液在平板上依然有菌落长出;当甲醛溶液终浓度达 0.40% 以上时,灭活 24 h,菌液在平板无菌落长出。37 °C 条件下,当甲醛溶液终浓度在 0.30% 时,灭活 24 h,菌液在平板即无菌落长出。见表 1。表明用终浓度 0.30% 的甲醛溶液于 37 °C 灭活 24 h,AV CA07 株菌液可完全灭活。

表 1 AV CA07 株菌液在不同条件下的灭活效果

Tab. 1 Inactivation effects of AV CA07 strain liquid at various conditions

温度(°C)	甲醛溶液终浓度(%)	灭活时间(h)	1次	2次	3次
28	0.10	24	+	+	+
		48	+	+	+
		72	+	+	+
	0.20	24	+	+	+
		48	+	+	+
		72	+	+	+
	0.30	24	+	+	+
		48	-	+	-
		72	-	-	-
	0.40	24	-	-	-
		48	-	-	-
		72	-	-	-
37	0.10	24	+	+	+
		48	+	+	+
		72	+	+	+
	0.20	24	+	+	+
		48	+	+	+
		72	+	+	+
	0.30	24	-	-	-
		48	-	-	-
		72	-	-	-
	0.40	24	-	-	-
		48	-	-	-
		72	-	-	-

注: +表示未灭活完全,有菌长出; -表示灭活完全,无菌长出。

2.2 AV CA07 株灭活疫苗规模化生产工艺的建立 AV CA07 株于种子罐和发酵罐培养约 10 h 时,菌液 A_{600} 均达最大值,10~12 h 时较平稳,见表 2。确定 AV CA07 株最佳培养时间为 10~12 h。AV CA07 株在 50 L 种子罐和 500 L 发酵罐培养 12 h 时,活菌数分别达 6×10^9 和 8×10^9 CFU/mL 以上,见表 3。AV CA07 株菌液可完全灭活,营养琼脂培养基无菌落长出。

表 2 50 L 种子罐和 500 L 发酵罐 AV CA07 株培养液的 A_{600} Tab. 2 A_{600} of AV CA07 strain culture medium in 50 L seed tank and 500 L fermenter

培养罐	培养时间(h)	1 批	2 批	3 批
50 L 种子罐	2	1.55	1.86	2.32
	4	4.36	4.56	4.16
	6	5.56	5.46	5.33
	8	6.60	6.74	6.64
	10	7.51	7.68	7.86
	12	7.44	7.63	7.80
500 L 发酵罐	2	3.56	3.45	3.36
	4	5.88	5.54	5.16
	6	7.78	7.28	6.74
	8	8.87	8.68	8.12
	10	9.20	9.16	8.94
	12	8.94	9.12	8.63

表 3 AV CA07 株 50 L 种子罐和 500 L 发酵罐培养液的活菌计数 ($\times 10^9$ CFU / mL)Tab. 3 Viable bacteria count of AV CA07 strain culture medium in 50 L seed tank and 500 L fermenter ($\times 10^9$ CFU / mL)

培养罐	1 批	2 批	3 批
50 L 种子罐	6.50	6.90	7.15
500 L 发酵罐	8.72	8.94	9.07

2.3 安全性试验 3 个疫苗免疫组及对照组的鱼全部健活,均未出现任何临床症状,摄食、游动及体色均正常,注射部位无红肿,内脏器官无病变,表明该灭活疫苗对鲫鱼具有良好的安全性。

2.4 免疫原性试验 3 个疫苗免疫组鲫鱼死亡数分别为 2、1、1 尾,相对免疫保护率分别为 93.10%、96.56%、96.56%,均达 90% 以上。对照组有 39 尾鲫鱼死亡,死亡率达 97%。

3 讨论

AV 广泛分布于水体环境中,是一种在外界环境中适应性较强的菌种,因此适宜 AV 生长的培养基种类较多,包括 NB、LB、TSB、BHI 培养基等^[11-13],商品化培养基价格普遍较高,规模化发酵培养基要求提高活菌数同时降低成本,因此不适用于规模化生产。本研究对比了优化发酵培养基与 NB、LB 两种培养基培养 AV 菌液的活菌数,结果表明,优化发酵培养基的活菌数更高,适合进行规模化发酵培养。发酵条件直接影响菌株培养最终产物的产量,影响较大的发酵参数包括转速、温度、接种量、pH、通气量等^[14-17]。

本研究建立了 AV CA07 株在 500 L 罐的规模化制备工艺,种子液以 5% 接种量接种至发酵培养基,于 28 °C,通气量 180 L / min 条件下,200 r / min 发酵培养 10 ~ 12 h,菌液活菌数约为 9.0×10^9 CFU / mL,经 3 批规模化发酵验证,发酵工艺稳定。在大型发酵罐规模化发酵过程中,受发酵菌液体积的影响,转速受到限制,通气量对最终产物的影响更明显。

常见的化学灭活剂有甲醛、 β -丙内酯(β -propiolactone, BPL)、N-乙酰乙烯亚胺(N-acetyleneimine, AEI)、二乙烯亚胺(binaryethyleneimine, BEI)、盐酸聚六亚甲基胍(polyhexamethylene guanidine hydrochloride and phosphate, PHMG)等,其中甲醛是最传统且应用最广泛的化学灭活剂。甲醛灭活效果受灭活剂的浓度、灭活时间、灭活温度等因素影响,通常以较低使用浓度、灭活时间短即可达到彻底灭活为评价指标。目前多数养殖动物如猪、牛、羊、鹿、水貂、禽类、鱼类的细菌灭活疫苗均是以甲醛溶液作为灭活剂^[18-25]。本研究对 AV CA07 株菌液的灭活条件优化结果表明,采用终浓度 0.30% 的甲醛溶液于 37 °C 灭活 24 h 即可完全灭活。

制备的 AV CA07 株灭活疫苗以高剂量免疫鲫鱼后,疫苗免疫组鱼注射部位无红肿,内脏器官无病变,无死亡,表明制备的灭活疫苗具有良好的安全性。免疫原性试验结果,制备的灭活疫苗对鲫鱼具有显著的免疫保护效果,相对免疫保护率达 90% 以上。

综上所述,本研究以优化条件制备的 AV CA07 株灭活疫苗具有良好的安全性和免疫原性,且生产工艺稳定,本研究为 AV 灭活疫苗的规模化制备及产业化应用奠定了基础。

参考文献

- [1] SHI X, ZHANG T T, GONG C L, *et al.* Gene expression pattern analysis of *Carassius auratus gibelio* infected by *Aeromonas veronii* [J]. *Anhui Agric Sci*, 2020, 48 (23): 131-137, 157. (in Chinese)
施秀, 张婷婷, 贡成良, 等. 维氏气单胞菌感染异育银鲫基因表达谱分析 [J]. *安徽农业科学*, 2020, 48 (23): 131-137, 157.
- [2] DENG S M, CHENG X F, LIU L, *et al.* Isolation and identification of pathogens from an outbreak deaths of *Similabeo decorus tungting* [J]. *J Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2020, 35 (3): 443-449. (in Chinese)
邓时铭, 程小飞, 刘丽, 等. 湘华鲮暴发性死亡病原菌的分离与鉴定 [J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35 (3): 443-449.
- [3] QIN H B, YUAN F H, YANG Y, *et al.* Isolation and identifica-

- tion of pathogenic *Aeromonas veronii* from Grass Carp [J]. *Fisheries Sci & Technol Inf*, 2019, 46 (3): 150-153. (in Chinese)
- 覃华斌, 袁富豪, 杨映, 等. 草鱼致病性维氏气单胞菌的分离鉴定 [J]. *水产科技情报*, 2019, 46 (3): 150-153.
- [4] ZHU R L, MA T, CHEN L, *et al.* Isolation, identification and virulence genes detection of *Aeromonas veronii* from *Aristichthys nobilis* [J]. *J Anhui Agricultural University*, 2017, 44 (2): 229-233. (in Chinese)
- 朱若林, 马腾, 陈露, 等. 鳊鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及其毒力基因检测 [J]. *安徽农业大学学报*, 2017, 44 (2): 229-233.
- [5] LI C, CAI Y, ZHOU Y C, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Aeromonas veronii* from *Tilapia* cultured in Hainan Province [J]. *Fisheries Sci*, 2015, 34 (10): 641-646. (in Chinese)
- 李聪, 蔡岩, 周永灿, 等. 海南罗非鱼致病性维氏气单胞菌分离鉴定及药敏特性研究 [J]. *水产科学*, 2015, 34 (10): 640-646.
- [6] LIN Y, FAN H P, CHEN B, *et al.* Isolation, identification and drug sensitivity of *Aeromonas veronii* infected *Mastacembelus aculeatus* [J]. *J Agriculture*, 2019, 9 (11): 50-56. (in Chinese)
- 林煜, 樊海平, 陈斌, 等. 大刺鲃致病性维氏气单胞菌分离鉴定及药物敏感性研究 [J]. *农学学报*, 2019, 9 (11): 50-56.
- [7] TIAN L, WEN G L, ZHANG S B, *et al.* Isolation and biological characterization of the pathogenic *Aeromonas veronii* from *Ictalurus punctatus* [J]. *Chin Animal Husbandry Veter Med*, 2018, 45 (11): 3203-3210. (in Chinese)
- 田浪, 温贵兰, 张升波, 等. 斑点叉尾鲷源致病性维氏气单胞菌的分离与生物学特性鉴定 [J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45 (11): 3203-3210.
- [8] LV G, SHI L, XU L W, *et al.* Antibiotic resistance of *Aeromonas veronii* and *Streptococcus agalactiae* in aquatic animals from Guangdong [J]. *Modern Food Sci Technol*, 2019, 35 (5): 289-295. (in Chinese)
- 吕观, 石磊, 徐力文, 等. 广东省水生动物中的维氏气单胞菌和无乳链球菌的耐药性评估 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35 (5): 289-295.
- [9] SONG M F, KANG Y H, ZHANG D X, *et al.* Immunogenicity of extracellular products from an inactivated vaccine against *Aeromonas veronii* TH0426 in koi, *Cyprinus carpio* [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2018, 81: 176-181.
- [10] KONG Y D, KANG Y H, TIAN J X, *et al.* Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing *flaB* confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2019, 87: 627-637.
- [11] ZHANG P, HU A D, YANG X, *et al.* Isolation, identification and virulence gene analysis of a Grass Carp *Aeromonas veronii* [J]. *Chin Animal Husbandry Veter Med*, 2020, 47 (3): 848-855. (in Chinese)
- 张飘, 胡安东, 杨霞, 等. 一株草鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及毒力基因分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47 (3): 848-800.
- [12] JIANG M Y, WANG H Q, ZHANG Z, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility of *Aeromonas Veronii* in *Pelteobagrus Fulvidrac* [J]. *Guangdong J Animal Veter Sci*, 2015, 40 (6): 39-41. (in Chinese)
- 江梦雅, 王汉清, 张震, 等. 黄颡鱼维氏气单胞菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *广东畜牧兽医科技*, 2015, 40 (6): 39-41.
- [13] SONG Z H, QIAO X, ZHANG Y J, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of *Aeromonas Veronii* [J]. *Chin J Veter Med*, 2011, 47 (1): 23-25. (in Chinese)
- 宋振辉, 乔霞, 张鸚俊, 等. 维氏气单胞菌的分离鉴定及系统进化分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47 (1): 23-25.
- [14] YIN Y N, WU J W, TAN J J, *et al.* Optimization of medium and culture conditions for *Bacillus cereus* NJSZ-13 [J]. *Zhejiang For Sci Technol*, 2020, 40 (6): 9-17. (in Chinese)
- 尹艳楠, 吴佳雯, 谈家金, 等. 松树内生蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株发酵培养基及条件优化 [J]. *浙江林业科技*, 2020, 40 (6): 9-17.
- [15] CHEN D D, LI Y Y, Qi S M, *et al.* Screening, Identification and fermentation optimization of an Antagonistic Bacterium M26 to *Ralstonia solanacearum* [J]. *Shandong Agricultural Sci*, 2020, 52 (9): 114-118. (in Chinese)
- 陈丹丹, 李圆圆, 齐素敏, 等. 一株青枯菌拮抗细菌 M26 的筛选、鉴定及其发酵条件优化 [J]. *山东农业科学*, 2020, 52 (9): 114-118.
- [16] MA L Y, GONG G L. Fermentation conditions of *Epithilone B* in pilot fermenter [J]. *J Microbiol*, 2015, 35 (1): 67-72. (in Chinese)
- 马利云, 龚国利. 埃博霉素 B 小试发酵罐发酵条件研究 [J]. *微生物学杂志*, 2015, 35 (1): 67-72.
- [17] WANG Y Z, WANG W J, LI J K, *et al.* Studies on the optimization of fermentation process of *Tricholoma Matsutake* in 10 L fermentor [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2018, 45 (17): 21-23. (in Chinese)
- 王艳珍, 王文君, 李吉科, 等. 松茸 10 L 发酵罐发酵工艺条件的研究 [J]. *广东化工*, 2018, 45 (17): 21-23.
- [18] LI X H, LUO Z, ZHANG L J, *et al.* Development and application of multiple vaccine of mastitis for cow [J]. *Shandong J Animal Sci Veter Med*, 2020, 41 (10): 11-13. (in Chinese)
- 李心海, 罗珠, 张林吉, 等. 奶牛乳房炎多联苗的研制及应用试验 [J]. *山东畜牧兽医*, 2020, 41 (10): 11-13.
- [19] PEI S X, SONG J J, HAN Y N, *et al.* Comparison of adjuvant for inactivated *Swine Erysipelas* vaccine against *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnical Sinica*, 2020, 51 (5): 1083-1090. (in Chinese)
- 裴世璇, 宋吉健, 韩忆依, 等. 猪丹毒丝菌灭活疫苗免疫佐剂的筛选 [J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51 (5): 1083-1090.
- [20] CAI J B, WANG A L, LI H M, *et al.* Isolation and identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from *White Goat* in South Shaanxi and development of an inactivated vaccine with aluminum hydroxide adjuvant [J]. *Progress Veter Med*, 2016, 37 (7): 49-52. (in Chinese)
- 蔡俊波, 王爱玲, 李海敏, 等. 陕南白山羊伪结核棒状杆菌分离鉴定及灭活铝胶疫苗研制 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37 (7): 49-52.

- removal / inactivation by nanofilm filtration and low pH incubation in human immunoglobulin for intravenous injection [J]. Int J Biologicals, 2021, 44 (1): 4. (in Chinese)
- 张宝献, 张剑涛, 刘亚芳, 等. 纳米膜过滤和低 pH 孵放法去除 / 灭活静注人免疫球蛋白中病毒效果的验证 [J]. 国际生物制品学杂志, 2021, 44 (1): 4.
- [3] MA S, PANG G L, SHAO Y J, *et al.* Validation and implementation of Planova BioEX virus filters in the manufacture of a new liquid intravenous immunoglobulin in China [J]. Biologicals J Int Association Biological Standardization, 2018, 52: 37-43.
- [4] GOUSSEN C, SIMONEAU S, BÉREND S, *et al.* Biological safety of a highly purified 10% liquid intravenous immunoglobulin preparation from human plasma [J]. Biodrugs, 2017, 31 (3): 251-261.
- [5] PENG Y, LI T J, ZHOU H Y, *et al.* Influence of different kinds of pre-filtration membranes on filtering efficacy of human immunoglobulin by nano film (DV20 nm) [J]. Chin J Biologicals, 2019, 32 (12): 1418-1420, 1424. (in Chinese)
- 彭焱, 李陶敬, 邹浩勇, 等. 不同种类预过滤膜对纳米膜 (DV20 nm) 过滤人免疫球蛋白效果的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32 (12): 1418-1420, 1424.
- [6] LACASSE D, LUTE S, FIADREIRO M, *et al.* Mechanistic failure mode investigation and resolution of parvovirus retentive filters [J]. Biotechnol Prog, 2016, 32 (4): 959-970.
- [7] STRAUSS D, GOLDSTEIN J, TOMOKO H H, *et al.* Characterizing the impact of pressure on virus filtration processes and establishing design spaces to ensure effective parvovirus removal [J]. Biotechnol Progress, 2017, 33 (5): 1294-1302.
- [8] WIESER A, BERTING A, MEDEK C, *et al.* Virus filtration and flow variation: an approach to evaluate any potential impact on virus retention [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2016, 70 (4): 325-331.
- [9] LU Y L, RONG X Z, WANG Y, *et al.* Validation and evaluation of virus inactivation / removal effect of the new production process of Intravenous injection of human immunoglobulin [J]. Chin J Biologicals, 2017, 30 (12): 1331-1334, 1339. (in Chinese)
- 卢杨利, 容新宗, 王焰, 等. 静注人免疫球蛋白新生产工艺病毒灭活 / 去除效果的验证及评估 [J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30 (12): 1331-1334, 1339.
- [10] HUANG J, WANG B, LU K L, *et al.* The effect of nanofiltration efficiency and quality by prefiltration system on intravenous injection of human immunoglobulin [J]. Biotech World, 2016 (2): 13-14. (in Chinese)
- 黄捷, 王炳, 卢奎林, 等. 预过滤系统对静注人免疫球蛋白纳米过滤的效率和影响 [J]. 生物技术世界, 2016 (2): 13-14.
- [11] LI G J, ZHANG J T, LIU Y F, *et al.* Establishment of intravenous injection of human immunoglobulin nanofiltration process model [J]. Int J Biologicals, 2016, 42 (1): 20-23. (in Chinese)
- 李冠军, 张剑涛, 刘亚芳, 等. 静注人免疫球蛋白纳米过滤工艺模型的建立 [J]. 国际生物制品学杂志, 2016, 42 (1): 20-23.
- [12] LI S Y. The explore of virus filtering optimized [J]. Process, 2020 (10): 57-59. (in Chinese)
- 李世燕. 除病毒过滤可优化点探讨 [J]. 流程工业, 2020 (10): 57-59.
- [13] LI B, YANG H H, WANG F S. Optimize the nanofiltration capacity of human immunoglobulin [J]. Chin J Blood Transfus, 2013, 26 (7): 638-639. (in Chinese)
- 李斌, 杨虎虎, 王凤山. 优化静注人免疫球蛋白纳滤载量 [J]. 中国输血杂志, 2013, 26 (7): 638-639.
- [14] YOKOYAMA T, MURAI K, MUROZUKA T, *et al.* Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration [J]. Vox Sang, 2004, 86 (4): 225-229.
- 收稿日期: 2022-03-02 编辑: 何巍
-
- (上接第 80 页)
- [21] LUO Q P, WANG H L, ZHANG R R, *et al.* Preparation and analysis immune effect of inactivated vaccine from *Pasteurella avians* by iron limited culture [J]. Chin Poultry, 2016, 38 (21): 51-53. (in Chinese)
- 罗青平, 王红琳, 张蓉蓉, 等. 限铁培养禽巴氏杆菌制备灭活疫苗及其免疫效果分析 [J]. 中国家禽, 2016, 38 (21): 51-53.
- [22] YANG P K, ZHANG Z X, SHEN H D, *et al.* Isolation and identification, drug sensitivity test and inactivated vaccine development of *Escherichia coli* from Shitou Geese [J]. Hubei Agricultural Sci, 2015, 54 (11): 2679-2682. (in Chinese)
- 杨培奎, 张振霞, 沈浩铨, 等. 狮头鹅大肠杆菌分离鉴定、药敏试验及灭活疫苗的制备 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54 (11): 2679-2682.
- [23] GONG H, CHEN L L, LAI Y T, *et al.* Study on the injection and immersion immunity of marine fish vibrio harveyi and vibrio alginolyticus inactivated vaccine for *Epinephelus obliquus* and *Pomfret* [J]. Guangdong Feed, 2020, 29 (4): 26-30. (in Chinese)
- 巩华, 陈丽玲, 赖迎迢, 等. 海水鱼哈维氏弧菌、溶藻弧菌病二联灭活疫苗对斜带石斑鱼和卵形鲳鲹的注射、浸泡免疫研究 [J]. 广东饲料, 2020, 29 (4): 26-30.
- [24] SUN C W, LI J, LAI Y T, *et al.* Optimization of production procedure for inactivated turbot *Vibrio anguillarum* vaccine [J]. Chin J Biologicals, 2019, 32 (3): 328-332. (in Chinese)
- 孙承文, 李杰, 赖迎迢, 等. 大菱鲆弧菌灭活疫苗生产工艺条件的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32 (3): 328-332.
- [25] LIU M Z, YU Q, XIAO H H, *et al.* Development and characterization of *Aeromonas Hydrophila* inactivated vaccine for *Ictalurus punctatus* in Guangxi [J]. J Guangxi Academy Sci, 2019, 35 (3): 239-245. (in Chinese)
- 刘明珠, 余庆, 肖贺贺, 等. 广西斑点叉尾鮰源嗜水气单胞菌灭活疫苗的制备 [J]. 广西科学院学报, 2019, 35 (3): 239-245.
- 收稿日期: 2022-01-14 编辑: 李靓