



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 39/02 (2020.02); C12N 1/20 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019134244, 25.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.10.2019

Дата регистрации:
16.06.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.10.2019

(45) Опубликовано: 16.06.2020 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1,
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный научный
центр - Всероссийский научно-
исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И.
Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской
академии наук"

(72) Автор(ы):

Дрошнев Алексей Евгеньевич (RU),
Булина Кристина Юрьевна (RU),
Алонцева Дарья Александровна (RU),
Завьялова Елена Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный научный
центр - Всероссийский
научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И.
Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской
академии наук" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2284830 C1, 10.10.2006.

ДРОШНЕВ А.Е. Оценка иммунного статуса
рыб, привитых против вибриоза лососевых,
"Ветеринария и кормление", 2018, N 6, с. 46-48.
ДРОШНЕВ А.Е., БУЛИНА К.Ю. и др.
Иммунопротективные свойства адъювант-
вакцины против вибриоза лососевых рыб,
"Актуальные вопросы ветеринарной
биологии", 2018, N 1 (37), с. 20-24. ЗАВЬЯЛОВА
Е.А., (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АДСОРБИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИБРИОЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и иктиопатологии и может использоваться для получения адсорбированной вакцины против вибриоза лососевых рыб. Применяется управляемый периодический процесс глубинного культивирования отобранных производственных штаммов галофильных вибрионов. Основной составляющей активного вещества вакцины является инактивированная суспензионная смесь галофильных вибрионов *Listonella (Vibrio) anguillarum* серотипа 01 ВИЭВ АФ 3/4 и серотипа 02 ВИЭВ ВБФ 07, выращенных по отдельности

в бульоне Хоттингера с содержанием 10% морской воды, соленость 3,3%, и аминного азота не менее 180% мг при температуре 25°C, в течение 26 ч, рН 7,8, рО₂ - 35% от насыщения кислородом воздуха, параллельно друг другу, до максимального уровня накопления микробных клеток в среде роста. Полученную микробную массу обрабатывают формалином до конечной концентрации 0,37%, затем подвергают 3-кратному переосаждению центрифугированием антигенов в 0,15 М фосфатно-солевом буфере рН 7,6, для избавления от консерванта и балластных

компонентов. Полученные антигены каждого серотипа с концентрацией $1,25 \times 10^9$ м.кл./см³ берут в равном соотношении, с учетом общей конечной концентрации $2,5 \times 10^9$ м.кл./см³ в смеси, в качестве адьюванта - гидроокись алюминия в виде 6%-ного

геля в объеме 12% от общего объема с последующим диспергированием на роторной установке. Способ позволяет получить препарат, обладающий длительной иммуногенностью, что в целом повышает качество целевого продукта. 4 пр.

(56) (продолжение):

ДРОШНЕВ А.Е. и др. Вакцинация в аквакультуре: История, закономерности и особенности проведения работ, "Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии", 2019, N 1 (29), с. 95-100.

R U 2 7 2 3 5 8 0 C 1

R U 2 7 2 3 5 8 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 723 580** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 39/02 (2020.02); C12N 1/20 (2020.02)(21)(22) Application: **2019134244, 25.10.2019**(24) Effective date for property rights:
25.10.2019Registration date:
16.06.2020

Priority:

(22) Date of filing: **25.10.2019**(45) Date of publication: **16.06.2020 Bull. № 17**

Mail address:

109428, Moskva, Ryazanskij pr-kt, 24, korp. 1,
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyj nauchnyj
tsentr - Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut eksperimentalnoj veterinarii imeni K.I.
Skryabina i YA.R. Kovalenko Rossijskoj akademii
nauk"

(72) Inventor(s):

**Droshnev Aleksej Evgenevich (RU),
Bulina Kristina Yurevna (RU),
Alontseva Darya Aleksandrovna (RU),
Zavyalova Elena Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Federalnyj nauchnyj
tsentr - Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut eksperimentalnoj veterinarii imeni K.I.
Skryabina i YA.R. Kovalenko Rossijskoj
akademii nauk" (RU)**

(54) METHOD FOR PRODUCING SALMON FISH VIBRIOSIS ADSORBED VACCINE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and ichthyopathology and can be used to produce adsorbed salmonids vibriosis vaccines. Controlled periodical process of deep cultivation of the selected production strains of halophilic vibrios is applied. Main component of the active substance of the vaccine is an inactivated suspension mixture of halophilic vibrios *Listonella (Vibrio) anguillarum* serotype 01 VIEV AF 3/4 and serotype 02 VEIV VBF 07, grown separately in Hottinger broth with 10 % sea water, salinity of 3.3 %, and amine nitrogen of not less than 180 % mg at 25 °C for 26 hours, pH 7.8, pO₂ – 35 % of saturation with air oxygen, parallel to each other, to a maximum level of accumulation of microbial cells in medium of

growth. Obtained microbial mass is treated with formalin to a final concentration of 0.37 %, then subjected to 3-fold reprecipitation with centrifugation of antigens in 0.15 M phosphate-salt buffer pH 7.6, to get rid of preserving agent and ballast components. Obtained antigens of each serotype with concentration of 1.25×10⁹ m.cl./cm³ are taken in equal proportions, taking into account the total final concentration of 2.5×10⁹ m.cl./cm³ in the mixture, as an adjuvant – aluminum hydroxide in 6 % of gel in volume of 12 % of total volume with further dispersion on rotary plant.

EFFECT: method enables to obtain a preparation having prolonged immunogenicity, which generally improves the quality of the end product.

1 cl, 4 ex

RU 2 723 580 C1

RU 2 723 580 C1

Изобретение относится к ихтиопатологии и биотехнологии и может использоваться предприятиями биологической промышленности, микробиологическими лабораториями, биотехнологами для получения адсорбированной вакцины против вибриоза лососевых рыб.

5 Вибриоз - инфекционная болезнь лососевых, угрей и других видов рыб, вызываемая бактерией из семейства *Vibrionaceae*, рода *Vibrio*. В России вибриоз встречается у дикой рыбы, а также в лососевых и угревых хозяйствах, использующих для выращивания рыб морскую или солоноватую воду и расположенных в бассейнах Балтийского, Баренцева, Белого и дальневосточных морей. Заболевание протекает энзоотически, сопровождается
10 массовой гибелью рыб и требует значительных затрат на оздоровление неблагополучных хозяйств.

Возникновению болезни способствуют высокая температура воды (выше 15°C), pH более 8,0, низкое содержание кислорода, загрязнение воды органическими веществами (БПК выше 2 мг/л) и азотными соединениями (содержание азота более 1 мг/л), хендлинг
15 (ручные манипуляции). При выращивании в морских садках потери рыб от заболевания достигают 70-100% в условиях очень низкой эффективности химиотерапии.

Инфекция наносит значительные прямые экономические потери для ферм, но также влечет и косвенные затраты, связанные с недополучением биомассы, расходом комбикормов, а также снижением товарных качеств мяса рыб, вплоть до частичной
20 или полной ветеринарно-санитарной выбраковки. У лососевых рыб вибриоз проявляется чаще в летний период, поражая рыб всех возрастов.

Уровень техники

Известен способ получения вакцины против вибриоза рыб путем культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде, при наблюдении за физико-химическими
25 показателями в процессе роста культур, по истечении времени проводят инактивацию формалином (патент РФ №2284830, бюл. №28, опубл. 10.10.2006, МПК А61К 39/02). Данный способ мы взяли за прототип.

Вышеназванный способ получения вакцины против вибриоза рыб основан на технологии культивирования вибрионов (*Vibrio anguillarum*) штаммы №2 и VUR-19),
30 включающей подготовку питательной среды для матровых расплодок штаммов, засев и контроль чистоты и типичности роста при проведении трех пассажей, культивирование в реакторе каждого штамма из расчета введения 5% к объему питательной среды, по истечению периода выращивания инактивация и гомогенизация, обеспечивающая получение однородной суспензии. Предложенная технология выращивания вибрионов
35 в реакторе длится 36-48 часов при температуре 18-25°C и постоянном перемешивании, достигая при этом максимального числа клеток, находящихся в стационарной фазе роста. Противовибриозную вакцину готовят с концентрацией бактериальных клеток 80-100 млрд. м.кл./см³.

Недостатком данного способа является низкое качество конечного продукта, так как данная вакцина пригодна только для иммерсионного способа иммунизации.
40 Использование препарата для отработанной в большинстве стран технологии внутрибрюшинной инъекции невозможно в связи с наличием в вакцине большого количества компонентов среды выращивания и формалина.

Данный способ позволяет получить бактерии, создающий у рыб иммунитет против
45 неопределенного серотипа галофильных вибрионов, что также не гарантирует обеспечение защищенности организма гидробионтов от спектра циркулирующих в природе эпизоотических штаммов *Listonella (vibrio) anguillarum* с разными типами антигенных детерминант. Таким образом, технической проблемой является

необходимость создания способа получения вакцины с высокой иммуногенной активностью, широким профилактическим спектром действия на септическую инфекцию рыб бактериальной этиологии.

Раскрытие сущности изобретения

5 Техническим результатом является вакцина, состоящая из активного вещества, которым является инактивированная суспензионная смесь галофильных вибрионов *Listonella (Vibrio) anguillarum* серотипа 01 (ВИЭВ АФ 3/4) и серотипа 02 (ВИЭВ ВБФ 07) и содержащая иммунопротектор - адъювант - гель гидроокись алюминия.

10 Предлагаемый способ позволяет обеспечить точность конечных концентраций антигенов в целевом продукте, который не содержит консервантов и балластных компонентов среды, что обеспечивает хорошую переносимость организмом рыб при интраперитонеальном введении. Включение в состав адсорбирующего адъюванта позволяет снижать дозу антигена при увеличении протективного действия готовой вакцины до 24 месяцев.

15 Предложенный способ заключается в следующем:

Для осуществления способа применяется управляемый периодический процесс глубинного культивирования отобранных производственных штаммов галофильных вибрионов, вакцина, изготовленная по предлагаемому способу, содержит активное
20 вещество и целевую добавку. Основным составляющим активного вещества является инактивированная суспензионная смесь галофильных вибрионов *Listonella (Vibrio) anguillarum* серотипа 01 (ВИЭВ АФ 3/4) и серотипа 02 (ВИЭВ ВБФ 07) выращенных в бульоне Хоттингера с содержанием 10% морской воды (соленость 3,3%) и аминного азота не менее 180 мг % параллельно друг другу в ферментере до максимального уровня накопления микробных клеток в среде роста, в дальнейшем проводится убивка
25 микробной массы с контролем полноты инактивации, отмывка клеток вибрионов от компонентов среды и формалина.

Отдельные емкости с бактериальной массой каждого штамма инактивируют формалином до значений 0,37% и подвергают 3-х кратному переосаждению центрифугированием антигенов в 0,15 М фосфатно-солевом буфере рН 7.6 (стандартного
30 состава), для избавления от консерванта и балластных компонентов. Полученные антигены каждого серотипа с концентрацией $1,25 \times 10^9$ м.кл./см³ берутся в смеси в равном соотношении, с учетом общей конечной концентрации $2,5 \times 10^9$ м.кл./см³, в качестве адъюванта - гидроокись алюминия (6%-ный гель) в объеме 12% от общего объема с
35 последующим диспергированием на роторной установке в течение 30 минут.

Все этапы подготовки ведутся в асептических условиях, чтобы конечный продукт отвечал ряду требований: стерилен, отсутствие консервантов (формалина), безвреден, активен. Предложенные приемы позволили впервые разработать препарат, обладающий
40 иммуногенностью длительного действия, что в целом повышает качество целевого продукта при возможностях технологического производства как в лабораторных, так и в промышленных условиях.

Адсорбированная вакцина против вибриоза лососевых рыб представляет собой жидкость светло-кремового цвета, при хранении образуется рыхлый белый осадок, легко разбивающийся в гомогенную взвесь при встряхивании. Препарат сохраняет
45 стабильность и активность при температуре 2-8°C в течение 6 месяцев.

В отличие от прототипа получение вакцины по предложенному способу сокращает основное время культивирования вибрионов практически в 2 раза, значительно уменьшает количество применения антигенов, снижая нагрузку на иммунную систему организма рыб и увеличивает экономическую эффективность. Сравнительный анализ

заявляемого способа получения вакцины и прототипа свидетельствует, что применяемые подходы повышают качество целевого продукта посредством увеличения иммуногенной активности, безвредности препарата. Это достигается за счет совершенствования технологии производства и масс-культивирования *Listonella (Vibrio) anguillarum* серотипов 01, 02.

Осуществление изобретения иллюстрируется следующими примерами промежуточного изготовления антигенов и получения целевого продукта:

Пример 1. Полученные матровые расплодки штаммов галофильных вибрионов серотипа 01 (ВИЭВ АФ 3/4) и серотипа 02 (ВИЭВ ВБФ 07), проверенные на чистоту и типичность вносят в ферментер из расчета 10% к объему питательной среды и активно перемешивают с регулировкой оборотов мешалки. Выращивание вибрионов проводят в жидкой питательной среде с содержанием 10% морской воды и аминного азота не менее 180 мг%. Культивирование проводят при температуре 25°C в течение 22 часов. В течение всего процесса рН среды регулируют на уровне 7,6, аэрацию р O₂ 35% от насыщения кислородом воздуха, концентрацию глюкозы до 0,3%. Каждый штамм выращивают отдельно, полученную микробную массу инактивируют формалином в течение 18 часов при температуре 37°C до конечной концентрации 0,37% к общему объему при постоянном перемешивании. Полноту инактивации определяют по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах типа триптозо-соевый агар и бульон, тиогликолевая среда, агар Сабуро, ДДА и ТСBS. Оптическую концентрацию клеток определяют спектрофотометрическим методом по калибровочной кривой.

Максимальный уровень накопления микробных клеток в среде роста при данном режиме составил 18×10^9 м.кл./см³.

Пример 2. Полученные матровые расплодки штаммов галофильных вибрионов серотипа 01 (ВИЭВ АФ 3/4) и серотипа 02 (ВИЭВ ВБФ 07), проверенные на чистоту и типичность вносят в ферментер из расчета 10% к объему питательной среды и активно перемешивают с регулировкой оборотов мешалки. Выращивание вибрионов проводят в жидкой питательной среде с содержанием 10% морской воды и аминного азота не менее 180 мг%. Культивирование проводят при температуре 25°C в течение 24 часов. В течение всего процесса рН среды регулируют на уровне 7,7, аэрацию р O₂ 35% от насыщения кислородом воздуха, концентрацию глюкозы до 0,4%. Каждый штамм выращивают отдельно, полученную микробную массу инактивируют формалином в течение 18 часов при температуре 37°C до конечной концентрации 0,37% к общему объему при постоянном перемешивании. Полноту инактивации определяют по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах типа триптозо-соевый агар и бульон, тиогликолевая среда, агар Сабуро, ДДА и ТСBS. Оптическую концентрацию клеток определяют спектрофотометрическим методом по калибровочной кривой.

Максимальный уровень накопления микробных клеток в среде роста при данном режиме составил 20×10^9 м.кл./см³.

Пример 3. Полученные матровые расплодки штаммов галофильных вибрионов серотипа 01 (ВИЭВ АФ 3/4) и серотипа 02 (ВИЭВ ВБФ 07), проверенные на чистоту и типичность вносят в ферментер из расчета 10% к объему питательной среды и активно перемешивают с регулировкой оборотов мешалки. Выращивание вибрионов проводят в жидкой питательной среде с содержанием 10% морской воды и аминного азота не менее 180 мг%. Культивирование проводят при температуре 25°C в течение 26 часов. В течение всего процесса рН среды регулируют на уровне 7,8, аэрацию р O₂ 35% от насыщения кислородом воздуха, концентрацию глюкозы до 0,5%. Каждый штамм

выращивают отдельно, полученную микробную массу инактивируют формалином в течение 18 часов при температуре 37°C до конечной концентрации 0,37% к общему объему при постоянном перемешивании. Полноту инактивации определяют по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах типа триптозо-соевый агар и бульон, тиогликолевая среда, агар Сабуро, ДДА и ТСBS. Оптическую концентрацию клеток определяют спектрофотометрическим методом по калибровочной кривой.

Максимальный уровень накопления микробных клеток в среде роста при данном режиме составил 24×10^9 м.кл./см³.

Пример 4. Полученные матровые расплодки штаммов галофильных вибрионов серотипа 01 (ВИЭВ АФ 3/4) и серотипа 02 (ВИЭВ ВБФ 07), проверенные на чистоту и типичность вносят в ферментер из расчета 10% к объему питательной среды и активно перемешивают с регулировкой оборотов мешалки. Выращивание вибрионов проводят в жидкой питательной среде с содержанием 10% морской воды и аминного азота не менее 180 мг%. Культивирование проводят при температуре 25°C в течение 28 часов. В течение всего процесса рН среды регулируют на уровне 7,8, аэрацию р О₂ 35% от насыщения кислородом воздуха, концентрацию глюкозы до 0,6%. Каждый штамм выращивают отдельно, полученную микробную массу инактивируют формалином в течение 18 часов при температуре 37°C до конечной концентрации 0,37% к общему объему при постоянном перемешивании. Полноту инактивации определяют по отсутствию роста микроорганизмов на питательных средах типа триптозо-соевый агар и бульон, тиогликолевая среда, агар Сабуро, ДДА и ТСBS. Оптическую концентрацию клеток определяют спектрофотометрическим методом по калибровочной кривой.

Максимальный уровень накопления микробных клеток в среде роста при данном режиме составил 24×10^9 м.кл./см³.

Данные, полученные при различных режимах культивирования вибрионов свидетельствуют о технологически верном подходе решения задачи, что позволяет, согласно примерам 1-4, в короткие сроки стабильно получать жизнеспособные клетки от 18 до 24×10^9 м.кл./см³. Из апробированных вариантов наиболее оптимальным представляется применяемый в примере 3, так как прослеживается баланс между временем, введенными дополнительно питательными веществами и конечным уровнем накопления микробных клеток, составившим максимально возможное 24×10^9 м.кл./см³. Применение режимов согласно примерам 1, 2 не позволяет достичь высоких значений выхода продукта, либо при прочих равных как в примере 4, требуется увеличение времени и расхода раствора глюкозы.

Для получения целевого продукта формализованные клетки подвергают трехкратному осаждению центрифугированием при 8500 g в течение 45 минут, и ресуспендированию в стерильном растворе 0,15 М фосфатно-солевого буфера рН 7,6 для удаления консерванта и балластных компонентов среды. Для изготовления трех серий вакцины антигены из штаммов вибрионов серотипов 01 и 02, полученные по примеру 3, смешивают в равном соотношении с концентрациями 500 млн/см³; 1,25 млрд/см³; 2,5 млрд/см³ с учетом конечной общей концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл./см³; $2,5 \times 10^9$ м.кл./см³; 5×10^9 м.кл./см³. К полученной суспензии добавляют стерильный 6%-ный гель гидрооксида алюминия в объеме 12% с дальнейшим диспергированием на роторной установке в течение 30 минут, последующей фильтрацией и фасовкой. Готовая вакцина должна отвечать требованиям: стерильна, отсутствие посторонних примесей и

консервантов, безвредна, иммуногенна, по внешнему виду - жидкость светло-кремового цвета с рыхлым осадком, легко разбивающимся при встряхивании в гомогенную взвесь.

Иммунологическую активность вакцины против вибриоза рыб серий 1-2 проверяли на радужной форели массой 200-250 г по результатам учета уровня специфических антител на протяжении 24 месяцев наблюдений и прямого заражения летальной дозой смеси вирулентных штаммов *Listonella (Vibrio) anguillarum* серотипов 01 и 02 через 300 5
градусо-дней после однократной внутривибриозной инъекции в дозе 0,1 см³. Полученные результаты показали, что к указанному сроку у лососевых рыб при температуре содержания выше 8°C формируются специфические защитные антитела, максимальное 10
ТАА 1:2048 - группа привитая вакциной серии 2 и 3 (общая концентрация антигенов 2,5×10⁹ м.кл./см³; 5×10⁹ м.кл./см³). В опытах заражения определена сохранность рыб для обеих серий вакцины. Тестирование препарата серии 1 выявило менее активный иммунный ответ: ТАА 1:256-1:1024, сохранность - 75% радужной форели.

В результате изучения эффективности экспериментальных серий вакцины определена 15
оптимальная прививочная доза 2,5×10⁹ м.кл./см³, обеспечивающая длительную напряженность иммунитета при ТАА 1:1024-1:2048 в течение 24 месяцев и сохранность до 97% рыб.

Использование меньших концентраций, а также увеличение антигенной нагрузки 20
вдвое приводило к снижению уровня защиты или сопоставимым результатам, что экономически нецелесообразно и увеличивает прессинг на организм чужеродных биомолекул.

Как показали результаты исследований, предлагаемый способ изготовления вакцины и условия применения позволяют получать целевой продукт высокого качества, что 25
снижает до минимума материальный ущерб, наносимый вибриозом лососевых рыб и нивелирует риски потерь в течение двух лет с отказом от применения химиотерапевтических препаратов.

Исходя из повсеместного распространения галофильных вибринов в морской среде, предсказуемой заболеваемости и массовой потери рыбы прослеживается необходимость 30
внедрения поголовной прививочной иммунизации, что определяет актуальность способа получения адсорбированной вакцины против вибриоза лососевых рыб и применение препарата с существенным экономическим эффектом.

(57) Формула изобретения

Способ получения адсорбированной вакцины против вибриоза лососевых рыб, 35
включающий получение матровых расплодов штаммов вибрионов на бульоне Хоттингера, культивирование в ферментере, инактивацию выращенных культур формалином, отличающийся тем, что для получения вакцины используют штаммы 40
галофильных вибрионов разных серотипов: *Listonella (Vibrio) anguillarum* серотипа 01 ВИЭВ АФ 3/4 и серотипа 02 ВИЭВ ВБФ 07, которые культивируют отдельно, но параллельно друг другу, глубинное культивирование проводят в жидкой питательной среде с содержанием 10% морской воды, соленость 3,3%, и аминного азота не менее 180 мг при температуре 25°C в течение 26 часов, рН среды регулируют на уровне 7,8; аэрацию рО₂ - 35% от насыщения кислородом воздуха, концентрацию глюкозы до 0,5%, 45
выход вибрионов при этом составляет 24×10⁹ м.кл./см³, инактивированные микробные клетки каждого штамма подвергают 3-кратному переосаждению центрифугированием антигенов в 0,15 М фосфатно-солевом буфере рН 7,6 и в дальнейшем объединяют в равных соотношениях объемов с концентрацией 1,25×10⁹ м.кл./см³ каждого,

закрывающим этапом вводится целевая добавка, содержащая иммунопротектор - адсорбирующий адъювант - 6%-ный гель гидроокиси алюминия в объеме 12% от общего объема с последующим диспергированием на роторной установке в течение 30 минут.

5

10

15

20

25

30

35

40

45