



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003555

(51) **A61K 31/255; A61P 33/00; A61P 31/04;**
2022.01 **A23K 50/80**

(13) **Y**

(21) 2-2023-00072 (22) 26/12/2017
(67) 1-2019-03883
(86) PCT/EP2017/084588 26/12/2017 (87) WO2018/115532 28/06/2018
(30) 16306811.7 23/12/2016 EP
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/09/2019 378A
(73) MIXSCIENCE (FR)
2 avenue de ker Lann, 35170 BRUZ, France
(72) FROUEL, Stéphane (FR); JOZWIAK, Frédéric (FR); BANCHEREAU, Thi (FR).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) **CHẾ PHẨM DỰA TRÊN CÁC HỢP CHẤT THIOSULFINAT VÀ/HOẶC
THIOSULFONAT ĐỂ SỬ DỤNG TRONG VIỆC NGĂN NGỪA NHIỄM KHUẨN Ở
ĐỘNG VẬT SỐNG DƯỚI NƯỚC**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm chứa ít nhất một hợp chất có công thức I : R-SO_a-S-R' (I), trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C1-C5 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh, ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm 0,003% khối lượng so với tổng khối lượng của chế phẩm. Chế phẩm này hữu dụng để ngăn ngừa nhiễm ký sinh trùng ở động vật sống dưới nước. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến sản phẩm thức ăn chứa chế phẩm theo giải pháp hữu ích.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm dựa trên các hợp chất thiosulfinat và/hoặc thiosulfonat và sản phẩm thức ăn chứa chế phẩm này. Các chế phẩm này hữu dụng trong ngăn ngừa nhiễm khuẩn ở động vật sống dưới nước, cụ thể là trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Thuật ngữ “nuôi trồng thủy sản” được dùng để đề cập đến việc nuôi các sinh vật sống dưới nước (cá, tảo, loài giáp xác, động vật thân mềm v.v.) trong môi trường khép kín (ao, sông, hồ, lồng). Được thực hiện trong vài triệu năm ở châu Á, hệ thống “thuần hóa” tài nguyên dưới nước này đã có sự phát triển đáng kể trên quy mô toàn cầu và đã trở thành hoạt động kinh tế đáng kể ở một số nước.

Ngày nay, thách thức lớn nhất trong ngành này là tối ưu hóa năng suất để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ phát triển liên tục. Lĩnh vực phát triển chính để đạt được mục đích này bao gồm việc gia tăng và đa dạng hóa các các loài nuôi trồng thủy sản. Ở các đơn vị sản xuất quy mô lớn, nơi mà động vật sống dưới nước tiếp xúc với các điều kiện bắt buộc, các vấn đề liên quan đến bệnh và sự xuống cấp của điều kiện môi trường thường gia tăng và dẫn đến tổn thất kinh tế đáng kể.

Việc ngăn ngừa và kiểm soát nhiễm khuẩn chủ yếu liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm thú y. Cho đến nay, vấn đề vi khuẩn đã được kiểm soát bằng cách sử dụng các chất kháng sinh. Việc sử dụng rộng rãi chất kháng sinh đã thúc đẩy sự phát triển các chủng vi khuẩn kháng thuốc. Sự kháng này có thể dễ dàng được truyền sang các chủng khác, hoặc sau sự biến đổi bộ gen đã có, hoặc bằng cách chuyển vật chất di truyền giữa các tế bào bởi plasmid hoặc vật ăn vi khuẩn. Sự kháng do chuyển plasmid đã được thấy trong nhiều tác nhân gây bệnh vi khuẩn bao gồm các loại *Aeromonas spp*, *Edwardsiella spp*, *Photobacterium spp*, *Streptococcus spp*, *Tenacibaculum spp*, *Vibrio spp*, *Yersinia spp* v.v.. Để hạn chế các vấn đề về tính kháng liên quan đến chất kháng sinh, các cách điều trị mà

được làm thích ứng thực tế với mỗi loài và các phương pháp khác cần được phát triển để duy trì môi trường vi khuẩn lành mạnh cho động vật.

Các biện pháp thay thế mà dường như có triển vọng hiện nay bao gồm chủng ngừa, kích thích miễn dịch, và lợi khuẩn.

Chủng ngừa là biện pháp quan trọng trong việc ngăn ngừa các bệnh nhiễm khuẩn ở người và động vật, và được sử dụng rộng rãi đối với cá. Thuật ngữ “vắc xin” có thể chỉ được áp dụng chính xác khi mục đích là để đạt được sự bảo vệ kéo dài bằng cách hoạt hóa bộ nhớ miễn dịch, vì nó hướng đến phản ứng miễn dịch đặc thù. Chủng ngừa yêu cầu sự kích thích sơ bộ bằng kháng nguyên và dựa vào tế bào lympho cần được thực hiện. Ngoài ra, phần lớn các vắc xin thương mại thường làm tăng tính kháng với chỉ một hoặc hai tác nhân gây bệnh cụ thể và chỉ tạo ra tính kháng bệnh tạm thời, và điều này hủy hoại các lợi ích của biện pháp thay thế này.

Các chất kích thích miễn dịch có thể tăng cường sự miễn dịch với một phạm vi rộng các tác nhân gây bệnh; do đó, chúng là không đặc thù. Kích thích miễn dịch có thể đạt được theo nghĩa chung hơn, ví dụ, bằng cách nhắm đến sự hoạt hóa bổ sung, sự hoạt hóa đại thực bào, sự thực bào tích tụ bởi bạch cầu trung tính và bạch cầu đơn nhân, và sự tiết cytokin, mà không yêu cầu phản ứng đặc thù với kháng nguyên xác định. Chất kích thích miễn dịch đã được nghiên cứu sâu ở cá và loài giáp xác, cả trên quy mô động vật và quy mô tế bào. Chúng được sử dụng làm chất phòng ngừa để chống lại các bệnh nhiễm khuẩn ở động vật và cũng có tác dụng làm phân tử cảnh báo, mà hoạt hóa hệ miễn dịch không đặc thù. Tuy nhiên, việc sử dụng một số chất kích thích miễn dịch trong thời gian dài dường như không tạo ra các ưu điểm bổ sung khi so sánh với liều đơn; sự quá liều có thể còn ức chế các phản ứng miễn dịch và do đó làm giảm sự phát triển của động vật. Cuối cùng, chúng thường có tác dụng trong thời gian ngắn và thường không hiệu quả khi bệnh xuất hiện. Do đó, biện pháp thay thế này cũng có các hạn chế.

Cuối cùng, trong vài năm gần đây, lợi khuẩn đã có tầm quan trọng lớn trong nuôi trồng thủy sản. Lợi khuẩn được xác định là các vi sinh vật sống mà có tác dụng có lợi trên vật chủ bằng cách điều chỉnh hệ vi khuẩn trong ruột của chúng theo cách tích cực, bằng cách tối ưu hóa việc sử dụng thực ăn tiêu thụ của chúng, kích thích phản ứng miễn dịch

với tác nhân gây bệnh của chúng, và bằng cách cải thiện chất lượng môi trường xung quanh chúng. Việc sử dụng lợi khuẩn và các sản phẩm thương mại chứa lợi khuẩn trong nuôi trồng thủy sản (thường trong nông trại nuôi tôm) có các kết quả nhất định cho thấy tính kháng bệnh mà tương tự với tính kháng bệnh thu được với chất kháng sinh được sử dụng hiện nay. Do đó có sự quan tâm đến biện pháp thay thế để giải quyết vấn đề về tính kháng chất kháng sinh. Tuy nhiên, theo định nghĩa, lợi khuẩn được sử dụng làm chất điều trị dự phòng. Chúng có thể ngăn ngừa sự xuất hiện bệnh, nhưng không tạo ra phương thức điều trị hiệu quả, vì chúng tác động lên vật chủ hơn là tác nhân gây bệnh. Ngoài ra, dưới dạng các vi sinh vật sống, khi chúng được áp dụng, không có sự điều trị hóa học khác nhằm chống lại các vi sinh vật như nấm hoặc sinh vật ký sinh có thể được sử dụng vì các sự điều trị này làm thay đổi hiệu quả của lợi khuẩn. Lợi khuẩn này cũng có thể bị tiêu diệt dễ dàng bởi các hợp chất hóa học hoặc thuốc mà làm ảnh hưởng đến hiệu quả của chúng và lợi ích dài hạn của chúng.

Các phương pháp thay thế này, mặc dù đã chứng tỏ hiệu quả của chúng, bị giới hạn bởi thực tế là chúng cơ bản được dùng để ngăn ngừa, thường đặc thù với một hoặc một số tác nhân gây bệnh, và rất không hiệu quả trong việc điều trị bệnh dài hạn. Các phương pháp này cũng phụ thuộc vào sinh lý của động vật chủ và một số yếu tố như di truyền của các loài, giai đoạn của chu kỳ sống, và môi trường nuôi tương tác với loại và liều của các sản phẩm này, mà có thể làm giảm hiệu quả của chúng.

Sự phát triển của các thành phần có hoạt tính tự nhiên có tính chất kháng khuẩn tạo ra hiệu quả mà ít phụ thuộc vào môi trường và chức năng sinh lý của vật chủ, và tạo ra phổ kháng vi khuẩn rộng hơn vì các thành phần có hoạt tính này nhắm trực tiếp đến tác nhân gây bệnh, mà cho phép hai loại ứng dụng: ứng dụng điều trị dự phòng ở vật chủ và ứng dụng điều trị ở vật chủ và môi trường nuôi.

Cũng được biết từ giải pháp kỹ thuật đã biết là propyl thiosulfinat (PTS: propyl thiosulfinate) và propyl thiosulfonat (PTSO: propyl thiosulfonate), mà là các dẫn xuất tự nhiên của họ hành (Alliaceae), như hợp chất kháng khuẩn và kháng vi khuẩn phổ rộng tác động tương đương đến các vi sinh vật đơn bào như vi khuẩn gram dương, vi khuẩn gram âm và các virus, hoặc các tác nhân gây bệnh khác như ký sinh trùng đa bào.

Ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 2552432 A2 đề xuất sử dụng hợp chất propyl thiosulfinat (PTS) có công thức $R-SO_a-S-R$, trong đó R là nhóm n-propyl ($-CH_2-CH_2-CH_3$), và các hợp chất propyl thiosulfonat (PTSO) có công thức $R-SO_a-S-R$, trong đó R là nhóm n-propyl ($-CH_2-CH_2-CH_3$), để làm giảm số lượng tác nhân gây bệnh thuộc loài ký sinh đơn bào ở động vật. Để chính xác, ký sinh đơn bào được xác định là sinh vật đơn bào mà là ký sinh trùng của động vật có xương sống và động vật không có xương sống. Thuật ngữ “ký sinh đơn bào” bao gồm các loại *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Gregarina*, *Monospora*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Theileri* và *Toxoplasma*. Chế phẩm được mô tả trong tài liệu này cơ bản được sử dụng trong lĩnh vực nuôi gia cầm, lợn, hoặc loài nhai lại, nhưng không bao gồm các loài dưới nước.

Công bố đơn quốc tế WO 2015049587 A2 đề xuất sử dụng các hợp chất tương tự để làm giảm ký sinh trùng gây bệnh ở động vật sống dưới nước. Để chính xác, ký sinh trùng nghiên cứu này bao gồm các ký sinh trùng thuộc các nhóm động vật khác nhau, như nhóm song chiên tảo ký sinh ngoài, trùng có lông tơ, trùng chân lông, giun sán như ngành đơn, sán lá, sán dây, giun tròn, ký sinh trùng ký sinh ngoài như động vật thân mềm, loài giáp xác, và rận biển. Tuy nhiên, tài liệu này không liên quan đến sự nhiễm vi khuẩn và virus của ao nuôi trồng thủy sản.

Ngoài ra, việc điều trị nhiễm khuẩn trong cấu trúc và môi trường nuôi vẫn tiếp tục.

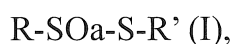
Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là làm giảm bớt các vấn đề nêu trên.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất chế phẩm mới thích ứng với việc nuôi trồng thủy sản.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất biện pháp hiệu quả mà được sử dụng một cách dễ dàng để điều trị hoặc ngăn ngừa sự nhiễm ký sinh trùng gặp phải trong việc nuôi trồng thủy sản.

Giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm chứa ít nhất một hợp chất có công thức I sau



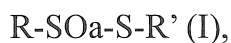
trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C_1-C_5 alkyl béo hoặc

không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh,

để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn, trên ít nhất tám ngày, trong việc ngăn ngừa sự nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là nhiễm vi khuẩn hoặc virus, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong cấu trúc nuôi trồng thủy sản, cụ thể là trong ao nuôi trồng thủy sản,

ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm 0,003% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm chứa ít nhất một hợp chất có công thức I sau



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C1-C5 alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh,

ít nhất một chất nền vô cơ, ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm 15% khối lượng dựa trên khối lượng của hỗn hợp gồm ít nhất một hợp chất nêu trên và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên,

để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn, trên ít nhất tám ngày, trong việc ngăn ngừa sự nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là nhiễm vi khuẩn hoặc virus, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong cấu trúc nuôi trồng thủy sản,

ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm 0,003% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Giải pháp hữu ích sẽ được hiểu rõ hơn dựa vào các hình vẽ sau.

Fig.1 thể hiện các đường cong minh họa tỷ lệ tử vong tích lũy (trục y) được thấy theo % ở cá vược con châu Âu *Dicentrarchus labrax*, 21 ngày sau khi nhiễm chủng *Photobacterium damsela subsp. piscicida* PP3, phụ thuộc vào cá không được bổ sung (đường cong có hình thoi màu đen) chế phẩm theo giải pháp hữu ích hoặc chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng ở mức 0,1% (tức là 0,003% PTS/PTSO; đường cong có

hình vuông màu xám) trong 28 ngày trước khi nhiễm thử nghiệm.

Fig.2 thể hiện các đường cong minh họa tỷ lệ tử vong được thấy ở cá rô phi con sông Nile *Oreochromis niloticus*, 21 ngày sau khi nhiễm *Streptococcus agalactiae*, phụ thuộc vào cá không được bổ sung (đường cong có các hình vuông màu đen) chế phẩm theo giải pháp hữu ích hoặc chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng ở mức 0,1% (tức là 0,003% PTS/PTSO; đường cong với hình chữ thập màu xám) hoặc cá được bổ sung chất kháng sinh (đường cong với các đường tròn) trong 28 ngày trước khi nhiễm thử nghiệm.

Fig.3 thể hiện các đường cong minh họa tỷ lệ tử vong được thấy ở hậu ấu trùng của tôm trắng *Penaeus vannamei*, 14 ngày sau khi nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*, phụ thuộc vào tôm không bị nhiễm (đường cong có các hình vuông màu xám) hoặc bị nhiễm (đường cong có các hình tam giác màu đen), hoặc bị nhiễm và được bổ sung bằng chế phẩm theo giải pháp hữu ích áp dụng ở mức 0,1% (đường cong có các hình chữ thập màu đen), hoặc ở mức 0,3% (đường cong với hình chữ thập màu xám), hoặc ở 0,5% (đường cong có các hình tròn màu xám) trong 20 ngày trước khi nhiễm thử nghiệm.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích được dựa trên sự quan sát bởi các tác giả giải pháp hữu ích rằng liều cụ thể của ít nhất một hợp chất có công thức I, sử dụng phương pháp áp dụng cụ thể, khiến cho có thể ngăn ngừa sự nhiễm khuẩn trong các cấu trúc nuôi trồng thủy sản. Các tác giả giải pháp hữu ích đã chứng tỏ rằng liều lượng 0,003% là đặc biệt thích hợp để ngăn ngừa sự nhiễm khuẩn.

Theo giải pháp hữu ích, “việc sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn” nghĩa là sử dụng một lần/ngày, hoặc thậm chí vài lần/ngày, ví dụ buổi sáng và buổi tối, hoặc buổi sáng, buổi trưa và buổi tối. Việc sử dụng này sẽ phụ thuộc vào thực tiễn của người nuôi và nhu cầu dinh dưỡng của động vật sống dưới nước đang xem xét. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết điều chỉnh tần suất theo loài.

Theo giải pháp hữu ích, “trên ít nhất tám ngày” nghĩa là trong 8 ngày, 9 ngày, 10 ngày, 11 ngày, 12 ngày, 13 ngày, 14 ngày, 15 ngày, 16 ngày, 17 ngày, 18 ngày, 19 ngày, 20 ngày, 21 ngày, 22 ngày, 23 ngày, 24 ngày, 25 ngày, 26 ngày, 27 ngày, 28 ngày, 29 ngày, 30 ngày, hoặc 31 ngày, hoặc thậm chí lớn hơn. Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực

kỹ thuật này sẽ điều chỉnh việc sử dụng theo nhu cầu điều trị dự phòng của của việc nuôi trồng thủy sản đang xem xét. Trong trường hợp bất kỳ, quan trọng là sử dụng trong ít nhất 8 ngày.

Trong việc sử dụng nêu trên, vi khuẩn dưới nước được nhắm đến bởi chế phẩm theo giải pháp hữu ích là vi khuẩn của các giống sau: *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Allivibrio*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Carnobacterium*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Edwardsiella*, *Elizabethkingia*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Hafnia*, *Halomonas*, *Lactococcus*, *Listonella*, *Moraxella*, *Moritella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Photobacterium*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Renibacterium*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, *Tenacibaculum*, *Vagococcus*, *Vibrio*, và *Yersinia*.

Trong việc sử dụng nêu trên, virus dưới nước được nhắm đến bởi chế phẩm theo giải pháp hữu ích là các virus thuộc các giống sau cũng như các giống virus sau: *Alphavirus*, *Aquabirnavirus*, *Baculovirus*, *Betanodavirus*, *Brevidensovirus*, *virus Cricket paralysis*, *Densovirus*, *Ebolavirus*, *Giardiavirus*, *Isavirus*, *Nodavirus*, *Novirhabdovirus*, *Okavirus*, *Orthomyxovirus*, *Ranavirus*, *Rhabdovirus*, *Totivirus*, và *Whispovirus*.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm chứa ít nhất hai hợp chất có công thức I sau



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C₁-C₅ alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, đối với việc sử dụng nêu trên,

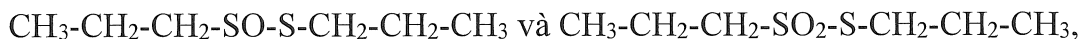
ít nhất hai hợp chất nêu trên có các cấu trúc hóa học khác nhau.

Nói cách khác, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm dùng cho việc sử dụng nêu trên, chế phẩm này chứa ít nhất hai, cụ thể là hai hợp chất có công thức I riêng biệt, ít hai hợp chất nêu trên chiếm 0,003% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Có thể đặc biệt có lợi nếu hai hợp chất, mà có các cấu trúc hóa học riêng biệt, sao cho hợp chất thứ nhất có a = 1 và hợp chất thứ hai có a = 2. Trong trường hợp bất kỳ, không

có trường hợp nào mà hai hợp chất này có thể có công thức hóa học giống nhau, hoặc chỉ khác nhau về dạng muối.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm dùng cho việc sử dụng nêu trên, trong đó chế phẩm này chứa hỗn hợp của các hợp chất sau



hỗn hợp này chiếm 0,003% khối lượng chế phẩm.

Theo giải pháp hữu ích, hợp chất có công thức $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ được đề cập đến dưới dạng di(n-propyl)thiosulfinat hoặc PTS, và hợp chất có công thức $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ được đề cập đến dưới dạng di(n-propyl) thiosulfonat hoặc PTSO.

Theo một phương án có lợi hơn, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm chứa hỗn hợp của PTS và PTSO, đối với việc sử dụng nêu trên.

Cũng có lợi nếu chế phẩm nêu trên ở dạng bột mà có thể được phân tán, ví dụ trong nước nuôi, hoặc được chứa trong thức ăn, hoặc được phân tán trên hoặc trong thức ăn.

Cụ thể là, có lợi nếu chế phẩm nêu trên chứa ít nhất một hợp chất, cụ thể là ít nhất hai hợp chất nêu trên, và chất nền vô cơ, ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm 15% khối lượng dựa trên khối lượng của hỗn hợp gồm ít nhất một hợp chất và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên.

Vẫn có lợi hơn nếu chế phẩm nêu trên chứa:

- a. hỗn hợp của ít nhất một hợp chất và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên với lượng 20% khối lượng,
- b. một hoặc nhiều hợp chất cho phép ổn định và phân tán chế phẩm trong nước với lượng nằm trong khoảng từ 40 đến 61% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, và một hoặc nhiều hợp chất kích thích tự miễn với lượng nằm trong khoảng từ 19 đến 40% khối lượng.

Chế phẩm đặc biệt có lợi theo giải pháp hữu ích là chế phẩm chứa các thành phần sau:

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và

metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit.

Chế phẩm đặc biệt có lợi theo giải pháp hữu ích là chế phẩm chứa các thành phần sau:

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

bentonit với lượng 34% khối lượng,

sepiolit với lượng 17% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và

metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit.

Ngoài ra, một trong số các khía cạnh đặc biệt có lợi của giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm được tạo ra bởi:

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

bentonit với lượng 34% khối lượng,

sepiolit với lượng 17% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và

metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit,

để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn, hoặc sử dụng thường xuyên hơn, trong chế phẩm bổ sung dinh dưỡng trên ít nhất tám ngày, trong việc ngăn ngừa sự nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là nhiễm vi khuẩn, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong ao nuôi trồng thủy sản,

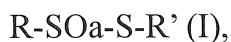
hỗn hợp PTS/PTSO được sử dụng ở với lượng 0,003% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Chế phẩm nêu trên là chế phẩm làm cho sản phẩm ổn định, dễ sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, và phân tán được trong nước với hoạt tính kháng vi khuẩn chủ yếu; sản phẩm này được tăng cường bởi các tính chất kích thích miễn dịch và bảo vệ hệ thống tế bào của động vật sống dưới nước mục tiêu.

Tóm lại, theo một trong số các khía cạnh có lợi, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng chế phẩm nêu trên ở tỷ lệ 0,1% tổng chế phẩm (chứa thành phần có hoạt tính có công thức I và các hợp chất khác). Vì có lợi nếu các hoạt chất của chế phẩm (PTS/PTSO) tạo ra 15% của phần 20% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, do đó cần hiểu rằng thành phần có hoạt tính (hỗn hợp PTS/PTSO) được sử dụng ở 0,003% khối lượng dựa

trên tổng khối lượng của chế phẩm ban đầu.

Nói cách khác, có lợi nếu giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm chứa ít nhất một hợp chất có công thức I sau



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C₁-C₅ alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh,

chế phẩm này được sử dụng ở trạng thái được pha loãng, được tạo huyền phù hoặc được phân tán theo tỷ lệ 1/1000, trong dung môi hoặc chất rắn, để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn, trên ít nhất tám ngày, trong việc ngăn ngừa sự nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là nhiễm vi khuẩn hoặc virus, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong cấu trúc nuôi trồng thủy sản,

sao cho ít nhất một hợp chất nêu trên, khi được sử dụng ở trạng thái được pha loãng, được tạo huyền phù hoặc được phân tán theo tỷ lệ 1/1000, chiếm 0,003% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm không được pha loãng, không được tạo huyền phù hoặc không được phân tán.

Có lợi hơn nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm dùng cho việc sử dụng nêu trên, trong đó động vật trong ao nuôi trồng thủy sản là cá hoặc loài giáp xác có mười chân.

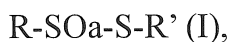
Ví dụ về cá và loài giáp xác có mười chân, cụ thể là tôm, được nêu dưới đây, mà không nhằm giới hạn.

Vẫn có lợi hơn nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm nêu trên đối với việc sử dụng nêu trên, trong đó ít nhất hai hợp chất là các tỷ lệ tương đối theo khối lượng thay đổi từ 60/40 đến 40/60.

Theo giải pháp hữu ích, hỗn hợp PTS/PTSO nghĩa là, trong đó PTS chiếm 60% hỗn hợp với PTSO, với PTSO chiếm 40% hỗn hợp và ngược lại. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất hỗn hợp chứa 50% của mỗi hợp chất trong số hai hợp chất này.

Ngoài ra, theo giải pháp hữu ích, “tỷ lệ tương đối từ 60/40 đến 40/60” nghĩa là các tỷ lệ PTS/PTSO sau: 60/40, 59/41, 58/42, 57/43, 56/44, 55/45, 54/46, 53/47, 52/48, 51/49, 50/50, 49/51, 48/52, 47/53, 46/54, 45/55, 44/56, 43/57, 42/58, 41/59, và 40/60.

Giải pháp hữu ích còn đề xuất chế phẩm chứa ít nhất một hợp chất có công thức I sau



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C₁-C₅ alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh,

để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn, trên ít nhất tám ngày, trong việc điều trị nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là vi khuẩn, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong cấu trúc nuôi trồng thủy sản, cụ thể là trong ao nuôi trồng thủy sản,

ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm từ 0,009 đến 0,012% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Theo giải pháp hữu ích, “từ 0,009 đến 0,012% khối lượng” nghĩa là các tỷ lệ bằng 0,009% khối lượng, 0,0091% khối lượng, 0,0092% khối lượng, 0,0093% khối lượng, 0,0094% khối lượng, 0,0095% khối lượng, 0,0096% khối lượng, 0,0097% khối lượng, 0,0098% khối lượng, 0,0099% khối lượng, 0,01% khối lượng, 0,0101% khối lượng, 0,0102% khối lượng, 0,0103% khối lượng, 0,0104% khối lượng, 0,0105% khối lượng, 0,0106% khối lượng, 0,0107% khối lượng, 0,0108% khối lượng, 0,0109% khối lượng, 0,0110% khối lượng, 0,0111% khối lượng, 0,0112% khối lượng, 0,0113% khối lượng, 0,0114% khối lượng, 0,0115% khối lượng, 0,0116% khối lượng, 0,0117% khối lượng, 0,0118% khối lượng, 0,0119% khối lượng, và 0,012% khối lượng.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm dùng cho việc sử dụng nêu trên, chế phẩm này chứa ít nhất hai, cụ thể là hai hợp chất có công thức I, chế phẩm chứa từ 0,009 đến 0,012% khối lượng hợp chất nêu trên, cụ thể là hai hợp chất, dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, cụ thể chế phẩm này chứa hỗn hợp của các hợp chất sau:

CH₃-CH₂-CH₂-SO-S-CH₂-CH₂-CH₃ và CH₃-CH₂-CH₂-SO₂-S-CH₂-CH₂-CH₃, cụ thể là theo các tỷ lệ từ 60:40 đến 40:60 khối lượng so với nhau, cụ thể là 50:50.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm được tạo ra bởi

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và

metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit,

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm được tạo ra bởi

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

bentonit với lượng 34% khối lượng,

sepiolit với lượng 17% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và

metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit,

để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn hoặc thường xuyên hơn trong thực phẩm bổ sung dinh dưỡng trên ít nhất tám ngày, trong việc điều trị sự nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là nhiễm vi khuẩn, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong ao nuôi trồng thủy sản,

hỗn hợp PTS/PTSO được sử dụng với lượng từ 0,009 đến 0,012% khối lượng dựa

trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Tóm lại, theo một trong số các khía cạnh có lợi, giải pháp hữu ích đề xuất việc sử dụng chế phẩm nêu trên ở tỷ lệ từ 0,3 đến 0,4% toàn bộ chế phẩm (chứa thành phần có hoạt tính có công thức I và các hợp chất khác). Vì có lợi nếu các hoạt chất của chế phẩm (PTS/PTSO) chiếm 15% của phần 20% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, do đó cần hiểu rằng thành phần có hoạt tính (hỗn hợp PTS/PTSO) được sử dụng với lượng từ 0,009 đến 0,012% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm ban đầu.

Nói cách khác, có lợi nếu giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm chứa ít nhất một hợp chất có công thức I sau



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C1-C5 alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh,

chế phẩm này được sử dụng ở trạng thái được pha loãng, được tạo huyền phù hoặc được phân tán theo tỷ lệ từ 3/1000 đến 4/1000, trong dung môi hoặc chất rắn, để sử dụng hàng ngày hoặc sử dụng đều đặn hơn, trên ít nhất tám ngày, trong việc ngăn ngừa sự nhiễm ký sinh trùng, và cụ thể là nhiễm vi khuẩn hoặc virus, ở động vật sống dưới nước được nuôi trong ao nuôi trồng thủy sản,

sao cho ít nhất một hợp chất nêu trên, khi được sử dụng ở trạng thái được pha loãng, được tạo huyền phù hoặc được phân tán theo tỷ lệ từ 3/1000 đến 4/1000, chiếm từ 0,009 đến 0,012% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm không được pha loãng, không được tạo huyền phù hoặc không được phân tán.

Hơn nữa, giải pháp hữu ích đề xuất sản phẩm thức ăn chứa ít nhất một chất dinh dưỡng, và chế phẩm như nêu trên, cho một trong số các việc sử dụng như nêu trên.

Sản phẩm thức ăn nêu trên chứa các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển, cho việc duy trì sự chuyển hóa cơ bản, và cho sự sống của động vật dự tính. Các chất dinh dưỡng này là các chất dinh dưỡng dựa trên các cacbohydrat, hoặc ở dạng đường đơn hoặc đường phức, các lipid, cụ thể là ở dạng axit béo bão hòa hoặc không bão hòa, sterol, hoặc protit, cụ thể là chứa tất cả hoặc một phần trong số hai mươi axit amin. Các chất dinh dưỡng

cũng chứa các khoáng chất và các vitamin. Chế phẩm thức ăn theo giải pháp hữu ích được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Ngoài ra, giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm chứa:

- ít nhất một hợp chất có công thức I sau:



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C1-C5 alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, và

- ít nhất một chất nền vô cơ,

ít nhất một hợp chất nêu trên chiếm 15% khối lượng dựa trên khối lượng của hỗn hợp gồm ít nhất một hợp chất nêu trên và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên.

Vẫn có lợi hơn nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm chứa

- ít nhất hai hợp chất có công thức I sau



trong đó a bằng 1 hoặc 2 và R và R' độc lập với nhau là nhóm C1-C5 alkyl béo hoặc không béo, mạch thẳng hoặc mạch nhánh, đối với việc sử dụng nêu trên,

ít nhất hai hợp chất nêu trên chiếm 15% khối lượng dựa trên khối lượng của hỗn hợp gồm ít nhất một hợp chất nêu trên và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên, ít nhất hai hợp chất nêu trên có các cấu trúc hóa học khác nhau,

và

- ít nhất một chất nền vô cơ.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm nêu trên, chứa:

a. hỗn hợp gồm ít nhất một hợp chất nêu trên, hoặc ít nhất hai hợp chất, và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên với lượng 20% khối lượng, ít nhất một hợp chất nêu trên, hoặc ít nhất hai hợp chất, chiếm 15% khối lượng dựa trên khối lượng của hỗn hợp gồm ít nhất một hợp chất nêu trên, hoặc ít nhất hai hợp chất, và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên,

b. các hợp chất cho phép ổn định và phân tán chế phẩm trong nước với lượng từ

40 đến 61% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, và

c. hợp chất kích thích miễn dịch với lượng từ 19 đến 40% khối lượng.

Vẫn có lợi hơn nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm được tạo ra bởi

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và

metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit.

Có lợi nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm nêu trên, chứa:

a. hỗn hợp của ít nhất một hợp chất nêu trên và ít nhất một chất nền vô cơ nêu trên với lượng 20% khối lượng,

b. các hợp chất cho phép ổn định và phân tán chế phẩm trong nước với lượng từ 40 đến 61% khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, và

c. hợp chất kích thích miễn dịch với lượng từ 19 đến 40% khối lượng.

Vẫn có lợi hơn nếu giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm được tạo ra bởi

hỗn hợp, được tạo ra bởi hỗn hợp PTS/PTSO với lượng 15% khối lượng và chất nền silic oxit với lượng 85% khối lượng, với lượng 20% khối lượng,

bentonit với lượng 34% khối lượng,

sepiolit với lượng 17% khối lượng,

sorbitol với lượng 10% khối lượng,

dextroza với lượng 5% khối lượng,

vitamin E với lượng 5% khối lượng và vitamin C với lượng 5% khối lượng, và metionin với lượng 4% khối lượng,

tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, ngoại trừ tỷ lệ phần trăm khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit, mà được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của hỗn hợp PTS/PTSO và chất nền silic oxit.

Hơn nữa, giải pháp hữu ích đề xuất sản phẩm thức ăn chứa ít nhất một chất dinh dưỡng, và chế phẩm như xác định ở trên.

Sản phẩm thức ăn nêu trên chứa các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển, cho việc duy trì sự chuyển hóa cơ bản, và cho sự sống của động vật dự tính. Các chất dinh dưỡng này là các chất dinh dưỡng dựa trên các cacbohydrat, hoặc ở dạng đường đơn hoặc đường phức, các lipit, cụ thể là ở dạng axit béo bão hòa hoặc không bão hòa, sterol, hoặc protit, cụ thể là chứa tất cả hoặc một phần trong số hai mươi axit amin. Các chất dinh dưỡng cũng chứa các khoáng chất và các vitamin. Chế phẩm thức ăn theo giải pháp hữu ích được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1 – Bào chế chế phẩm theo giải pháp hữu ích

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được dựa trên khả năng kháng khuẩn của các hợp chất R-SOa-S-R. Một trong số các dạng có lợi của chế phẩm theo giải pháp hữu ích chứa các hợp chất R-SOa-S-R cụ thể, trộn lẫn với bảy thành phần khác có các tính chất làm ổn định và kích thích miễn dịch. Chế phẩm được tạo ra theo cách sao cho tạo ra sản phẩm mà ổn định, dễ sử dụng trong nuôi trồng thủy sản, và phân tán được trong nước có hoạt tính kháng vi khuẩn chủ yếu, mà được tăng cường bởi các tính chất kích thích miễn dịch, và bảo vệ hệ tế bào của động vật sống dưới nước đích.

Bước thứ nhất trong việc sản xuất chế phẩm bao gồm việc tạo ra các hợp chất R-SOa-S-R. Mặc dù các hợp chất này có thể thu được từ việc tổng hợp hóa học, có lợi nếu chúng có thể được chiết từ cây thuộc họ hành (theo danh pháp phát sinh loài APG) và cụ thể là giống tỏi, mà là một thành viên của họ này. Phần lớn các cây đã biết thuộc giống tỏi

là tỏi tây (*Allium ampeloprasum*), hành (*Allium cepa* L.), củ tỏi được trồng (*Allium sativum* L.), hành tăm (*Allium ascalonicum*), hành tươi (*Allium fistulosum* L.), và họ (*Allium schoenoprasum* L.).

PTSO cũng có thể thu được bằng cách tổng hợp hoặc phân ly (hoặc oxy hóa) PTS. Việc thu được PTS bằng cách chiết và việc thu được PTSO được mô tả cụ thể trong đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP A11721534. Các hợp chất R-SOa-S-R cũng có thể thu được theo các phương pháp được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Pháp số FR A2813884.

Khi thu được, các hợp chất R-SOa-S-R, ở dạng dầu, sau đó được trộn với silic oxit theo tỷ lệ khối lượng 15:85 (%) để biến đổi dung dịch hợp chất thành bột.

Tiếp đó, bột này chứa các hợp chất R-SOa-S-R được trộn với bảy thành phần sau ở dạng bột và theo tỷ lệ được thể hiện, bằng cách sử dụng thiết bị trộn công nghiệp: bentonit (34%), bột chứa các hợp chất R-SOa-S-R (20%), sepiolit (17%), sorbitol (10%), dextroza (5%), vitamin E (5%), vitamin C (5%), và metionin (4%), tỷ lệ phần trăm được biểu thị theo khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

Tại thời điểm này, các hợp chất R-SOa-S-R chiếm 3% khối lượng của chế phẩm.

Việc áp dụng chế phẩm gồm 8 thành phần chiếm từ 0,1 đến 0,4% khối lượng thức ăn nghĩa là các hợp chất R-SOa-S-R chiếm từ 0,003 đến 0,012% khối lượng cuối của thức ăn.

Thức ăn được mô tả theo giải pháp hữu ích là thức ăn dự định để nuôi động vật, và chính xác hơn để động vật trong nuôi trồng thủy sản nhằm cung cấp cho chúng các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển, sống và sự chuyển hóa cơ bản của chúng. Ở đây, thuật ngữ “thức ăn nuôi trồng thủy sản” có nghĩa là thức ăn thường được tạo ra bởi người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thức ăn nuôi trồng thủy sản có thể được xem là thức ăn nhân tạo (tức là thức ăn được chế biến và được sản xuất) để bổ sung hoặc thay thế thức ăn tự nhiên trong ngành nuôi trồng thủy sản. Thức ăn này thường được tạo ra ở dạng phiến, hạt hoặc viên nén.

Thông thường, nguyên liệu nuôi trồng thủy sản đề cập đến nguyên liệu nhân tạo mà hữu dụng cho sự phát triển của cá và loài giáp xác có mười chân. Thức ăn được chế biến

này được tạo ra bởi các thành phần khác nhau theo các tỷ lệ thay đổi, mà bổ sung cho nhau để tạo ra thức ăn hoàn chỉnh đáp ứng các yêu cầu dinh dưỡng của các loài nuôi trồng thủy sản đích.

Thức ăn nuôi trồng thủy sản bao gồm các thành phần nhỏ và thành phần lớn. Nói chung, các thành phần được sử dụng với liều lớn hơn 1% được gọi là thành phần lớn. Các thành phần được sử dụng với liều lượng nhỏ hơn 1% được gọi là thành phần nhỏ. Mỗi trong số các loại thành phần lớn và thành phần nhỏ này được chia thành các thành phần có các chức năng dinh dưỡng hoặc chức năng kỹ thuật. Các thành phần có chức năng kỹ thuật cải thiện chất lượng vật lý của thức ăn nuôi trồng thủy sản. Các thành phần có chức năng dinh dưỡng cung cấp cho động vật sống dưới nước các chất dinh dưỡng và năng lượng mà cần thiết cho sự phát triển, sống, và sự chuyển hóa cơ bản của chúng. Các chất dinh dưỡng này là các chất dinh dưỡng dựa trên cacbohydrat, hoặc ở dạng đường đơn hoặc đường phức, các lipid, cụ thể là ở dạng axit béo bão hòa hoặc không bão hòa, sterol, hoặc protit, cụ thể là chứa tất cả hoặc một phần trong số hai mươi axit amin. Các chất dinh dưỡng cũng chứa các khoáng chất và các vitamin

Chế phẩm có thể được chứa trong thức ăn trong các giai đoạn phát triển ấu trùng, hậu ấu trùng, hoặc ấu thể, hoặc giai đoạn phát triển khác bất kỳ của động vật nuôi trồng thủy sản.

Khi không có bệnh bất kỳ, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung dưới dạng biện pháp ngăn ngừa vào thức ăn nuôi trồng thủy sản và qua quá trình sản xuất đối với thức ăn này ở liều lượng 0,1%. Chế phẩm, mà được xem là thành phần nhỏ, được kết hợp ở thời điểm tại đó các thành phần được trộn lẫn ở liều lượng đề xuất, trước quy trình ép đùn hoặc ép.

Khi đã mắc bệnh, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung dưới dạng biện pháp điều trị vào thức ăn nuôi trồng thủy sản trực tiếp vào hạt ép đùn và ở liều lượng 0,4%. Lượng chế phẩm ở dạng bột, tương đương với 0,4% thức ăn, được pha loãng trong nước theo tỷ lệ bột:nước bằng 1:15, và tiếp đó được phun trực tiếp lên bề mặt của thức ăn bằng cách sử dụng cần phun. Nếu cần, sau đó các hạt được phủ bằng dầu động vật hoặc dầu thực vật để ngăn không cho chế phẩm tạo muối khi ở trong nước nuôi của các loài dưới nước.

Ví dụ 2 – Hiệu quả *in vitro*

Hoạt tính kháng vi khuẩn của chế phẩm theo giải pháp hữu ích được thử nghiệm bằng cách đo nồng độ ức chế tối thiểu được biểu thị theo phần triệu (ppm) đối với 10 tác nhân gây bệnh vi khuẩn dưới nước. Vi khuẩn nước mềm được tạo ra bởi *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella ictaluri* và *Yersinia ruckeri*, trong khi vi khuẩn nước biển hoặc vi khuẩn nước lợ được tạo ra bởi *Aeromonas salmonicida*, *Photobacterium damsela damsela*, *Streptococcus iniae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum discolor*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, và *Vibrio anguillarum*.

Chế phẩm (A), được tạo ra bởi nhóm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích cũng như 3 sản phẩm tự nhiên được công nhận dưới dạng có hoạt tính kháng vi khuẩn: (B) xitrala, mà là thành phần chính của dầu sả và các dầu từ các cây khác của giống *Cymbopogon*, (C) eugenol, thành phần chính của đinh hương, và (D) carvacrol, thành phần chính của dầu xạ hương và dầu kinh giới, được cho vào dung dịch trong nước cất và được pha loãng liên tiếp trong nước cất trực tiếp trong các lỗ của vi đĩa 96 lỗ. 100 µl môi trường nuôi vi khuẩn đích với lượng gồm 10^6 đơn vị tạo thành cụm khuẩn/ml (CFU/ml) được bổ sung vào mỗi lỗ trong vi đĩa ở thời điểm cấy. Tiếp đó vi đĩa được nuôi cấy trong 18 giờ ở 25°C. Tiếp đó nồng độ ức chế tối thiểu được tính bằng cách quan sát các lỗ mà thể hiện và không thể hiện sự phát triển vi khuẩn dưới dạng hàm của liều lượng của chế phẩm hoặc sản phẩm kết hợp. Nồng độ ức chế tối thiểu càng thấp thì sản phẩm càng hiệu quả hơn, vì cần ít sản phẩm hơn để tạo ra sự ức chế tác nhân gây bệnh.

Sau 18 giờ nuôi cấy, các kết quả (bảng 1 dưới đây) cho thấy rằng chế phẩm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích có nồng độ ức chế tối thiểu thấp nhất, phụ thuộc vào chủng tác nhân gây bệnh, nằm trong khoảng từ 16 đến 125 ppm, so với 64 đến 1000 ppm đối với sản phẩm B, so với 64 và 2000 ppm đối với sản phẩm C, và so với 32 và 250 ppm đối với sản phẩm D. Các giá trị này cho thấy rằng hiệu quả của chế phẩm theo giải pháp hữu ích là tốt nhất khi so sánh với các sản phẩm kháng khuẩn khác.

Bảng 1. Bảng 1 thể hiện nồng độ ức chế tối thiểu (biểu thị theo ppm) so với 10 chủng tác nhân gây bệnh của chế phẩm theo giải pháp hữu ích so với 3 sản phẩm được công nhận là kháng khuẩn. (A) Chế phẩm được tạo ra bởi nhóm gồm 8 thành phần được

mô tả theo giải pháp hữu ích, (B) xitrala, (C) eugenol, và (D) carvacrol.

	(A)	(B)	(C)	(D)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	64	250	250	250
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	125	1000	500	250
<i>Photobacterium damsela</i>	32	500	1000	125
<i>Streptococcus iniae</i>	125	500	1000	64
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	16	64	64	32
<i>Tenacibaculum discolor</i>	16	64	125	64
<i>Vibrio harveyi</i>	64	1000	1000	250
<i>Vibrio alginolyticus</i>	125	1000	2000	250
<i>Vibrio anguillarum</i>	16	500	1000	64
<i>Yersinia ruckeri</i>	125	1000	500	250

Ví dụ 3 – So sánh tác dụng của PTS/PTSO và của chế phẩm theo giải pháp hữu ích

Hoạt tính kháng vi khuẩn của chế phẩm theo giải pháp hữu ích (A) và hỗn hợp được tạo ra bởi các hợp chất R-SOa-S-R đơn (B) được so sánh với hoạt tính kháng vi khuẩn của các chất kháng sinh đối chứng được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản (enrofloxacin (C), erythromycin (D), và oxytetracycline (E)). Chúng được thử nghiệm bằng cách đo nồng độ ức chế tối thiểu biểu thị theo ppm đối với 5 tác nhân gây bệnh vi khuẩn dưới nước: *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*.

Sau khi làm tan băng và nuôi cấy cấp hai các chủng tác nhân gây bệnh, các chủng này được nuôi cấy trong môi trường lỏng Marine Broth trong điều kiện hiếu khí 25°C trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn thay đổi phụ thuộc vào chủng, và đạt tới 10^7 đến 10^9 CFU/ml sau 24 giờ. Tiếp đó các chủng tác nhân gây bệnh này được pha loãng để đạt đến mật độ 10^6 CFU/ml đối với các thử nghiệm thử thách.

Hỗn hợp được tạo ra bởi các hợp chất R-SOa-S-R đơn hoặc chế phẩm được tạo ra bởi nhóm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích cũng như 3 chất kháng sinh đích được cho vào dung dịch trong nước cất và được pha loãng liên tiếp trong nước cất

trực tiếp trong các lỗ của vi đĩa 96 lỗ. 100 µl môi trường nuôi vi khuẩn đích với lượng 10^6 CFU/ml được bổ sung vào mỗi lỗ trong vi đĩa ở thời điểm cấy. Tiếp đó vi đĩa được nuôi cấy trong 18 giờ ở 25°C. Tiếp đó nồng độ ức chế tối thiểu được tính bằng cách quan sát các lỗ mà thể hiện và không thể hiện sự phát triển vi khuẩn dưới dạng hàm của liều lượng của chế phẩm hoặc chất kháng sinh kết hợp. Các thử nghiệm được lặp lại tối thiểu 3 lần trong một dãy để thu được giá trị trung bình thực.

Sau 18 giờ nuôi cấy, các kết quả (bảng 2 dưới đây) cho thấy rằng chế phẩm dựa trên các hợp chất R-SOa-S-R đơn chiếm 20% chế phẩm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích có nồng độ ức chế tối thiểu mà tương tự với chế phẩm gồm 8 thành phần. Do đó các thành phần của chế phẩm này tạo ra sự hiệp trợ mà tăng cường khả năng kháng vi khuẩn của chế phẩm dựa trên các hợp chất R-SOa-S-R đơn và khiến cho có thể giảm liều lượng của các hợp chất R-SOa-S-R này trong toàn bộ chế phẩm bởi hệ số bằng 5, làm cho việc áp dụng chế phẩm này khả thi về mặt kinh tế.

Hơn nữa, sau 18 giờ nuôi cấy, chế phẩm dựa trên các hợp chất R-SOa-S-R đơn cũng như chế phẩm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích có nồng độ ức chế tối thiểu nằm trong khoảng từ 19 đến 150 ppm phụ thuộc vào chủng, mà là tương tự (khác biệt bởi nhỏ hơn hệ số 10) với nồng độ ức chế tối thiểu thu được với chất kháng sinh: 3 đến 9 ppm đối với enrofloxacin, 19 đến 300 ppm đối với oxytetracyclin, và 25 đến 75 ppm đối với erytromyxin.

Bảng 2. Bảng 2 thể hiện nồng độ ức chế tối thiểu (ppm) đối với 5 chủng tác nhân gây bệnh của chế phẩm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích (A) so với hỗn hợp được tạo ra bởi các hợp chất R-SOa-S-R đơn (B) và 3 chất kháng sinh được quan tâm trong việc nuôi trồng thủy sản: enrofloxacin (C), erytromyxin (D), và oxytetracyclin (E).

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	75	75	9,38	9,38	>300
<i>Streptococcus iniae</i>	18,75	18,75	4,69	<3,125	12,5
<i>Vibrio anguillarum</i>	25	18,75	3,12	50	18,75
<i>Vibrio harveyi</i>	100	150	6,25	50	37,5

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	50	37,5	<3,12	18,75	12,5
--------------------------------	----	------	-------	-------	------

Ví dụ 4 – Thử nghiệm hiệu quả của giải pháp hữu ích

Trong trường hợp thứ nhất, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được thử nghiệm dưới dạng phương pháp ngăn ngừa các bệnh do vi khuẩn trong việc nuôi trồng thủy sản.

Được thử nghiệm trong các điều kiện thử nghiệm nuôi cá vược châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*), và tôm trắng (*Penaeus vannamei*), lần lượt được nhiễm *Photobacterium damsela*, gây ra bệnh do pasteurella ở cá vược, *Streptococcus agalactiae*, gây ra bệnh do liên cầu khuẩn ở cá rô phi, và *Vibrio parahaemolyticus*, gây bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm.

A- Nuôi cá vược châu Âu

Đối với cá vược châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), cá con, nặng $8,7 \pm 0,7$ g, được phân bố trong thùng bằng sợi thủy tinh dung tích 200 l ở tỷ lệ 35 con/thùng. Nước biển, ở độ mặn 35‰ và nhiệt độ $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, được tuần hoàn liên tục trong hệ thống nuôi. Chu kỳ 14 giờ sáng/10 giờ tối trong một ngày được thực hiện với sự oxy hóa nước được duy trì ở mức trên 90%.

2 cách điều trị được áp dụng: (A) thức ăn chuyên dùng cho cá vược châu Âu mà không được bổ sung và (B) thức ăn chuyên dùng cho cá vược châu Âu được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp phòng ngừa ở mức 0,1% thức ăn. Liều lượng 0,1% tương ứng với sự ước tính liều lượng hiệu quả cần thiết để quan sát hiệu quả của chế phẩm nêu trong các ví dụ 2 và 3.

Mỗi cách điều trị được chia thành 3 nhóm giống nhau. Vì hệ thống sử dụng sự tuần hoàn, nên sự lan truyền tác nhân gây bệnh giữa các thùng có thể nhận thấy được và do đó không thể thực hiện điều trị mà không có cá bị nhiễm.

Trong toàn bộ thời gian thử nghiệm (28 ngày không nhiễm tiếp theo là nhiễm, tiếp đó là 21 ngày theo dõi sau nhiễm), cá được cho ăn tùy ý 3 lần/ngày (09:00, 14:00 và 17:00) trong tuần và hai lần/ngày (10:00 và 16:00) vào cuối tuần.

Thức ăn chuyên dùng cho cá vược châu Âu (A và B) được chế biến để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của loài này. Do đó thức ăn này chứa 44% protein và 17% chất béo. Mỗi

thức ăn được sản xuất theo quy trình xác định rõ ràng. Các thành phần rắn tạo ra thức ăn được nghiền trong máy nghiền búa (Hosokawa Micron, SH1, Hà Lan) để thu được mức nghiền nhỏ hơn 200 μm . Bột thu được được trộn với chế phẩm theo giải pháp hữu ích (trong cách điều trị thứ nhất) và với các thành phần lỏng, như dầu, trong thiết bị trộn kiểu cánh quạt (Mainca RM90, Tây Ban Nha). Tiếp đó hỗn hợp được làm ẩm bằng 25% nước. Sau đó, thức ăn được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình ép đùn ở nhiệt độ được kiểm soát bằng thiết bị ép đùn vít kép (Italplast P55, Italia). Kích cỡ cuối của hạt thức ăn là 1,5 mm. Tiếp theo quy trình ép đùn, thức ăn được sấy trong lò đối lưu (OP 750-UF, LTE Scientifics, Vương quốc Anh) ở 40°C trong 6 giờ.

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung vào thức ăn trong cách điều trị (B) trong quy trình ép đùn ở liều lượng 0,1%.

Sau 28 ngày nuôi trong các điều kiện nêu trên, cá trong mỗi thùng bị nhiễm chủng *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* PP3. Sau khi gây mê cá sau sự nhúng chìm trong 2-phenoxyethanol ở 200 ppm, tác nhân gây bệnh được tiêm qua màng bụng với 50 μl môi trường TSB (TSB: tryptic soy broth) chứa 10^3 CFU/ml chủng PP3. Một sự tiêm được thực hiện.

Tỷ lệ tử vong được theo dõi trong 21 ngày. Cá chết được lấy hàng ngày ra khỏi thùng. Trong thời gian này, cá tiếp tục được nuôi với các cách điều trị nêu trên.

Kết quả tỷ lệ tử vong (Fig.1) cho thấy rằng, 21 ngày sau khi tiêm chủng tác nhân gây bệnh thuộc chủng *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* PP3, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng ở mức 0,1% thức ăn làm tăng đáng kể sức kháng của cá vượt con châu Âu với tác nhân gây bệnh. Bởi vậy, tỷ lệ tử vong được giảm 18,1% so với việc điều trị mà không được thực hiện với chế phẩm bất kỳ. Tỷ lệ tử vong tương tự cũng được giữ ổn định 7 ngày sau khi tiêm đối với cách điều trị chứa chế phẩm.

B- Nuôi cá rô phi

Đối với cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*), cá con, nặng $12 \pm 0,4$ g, được phân bố trong thùng bằng chất dẻo dung tích 100 l ở tỷ lệ 30 con/thùng. Nước, có độ mặn 0‰ và nhiệt độ $28,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$, được thay thế liên tục ở tỷ lệ 200 l/h.

3 cách điều trị được áp dụng: (A) thức ăn chuyên dùng cho cá rô phi sông Nile mà không được bổ sung, (B) thức ăn chuyên dùng cho cá rô phi sông Nile được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp phòng ngừa ở mức 0,1% thức ăn, và (C) thức ăn chuyên dùng cho cá rô phi sông Nile mà được bổ sung chất kháng sinh (amoxycilin).

Mỗi cách điều trị được chia thành 5 nhóm giống nhau. Vì hệ thống sử dụng sự tuần hoàn, nên sự lan truyền tác nhân gây bệnh giữa các thùng có thể nhận thấy được và do đó không thể thực hiện điều trị mà không có cá bị nhiễm.

Trong toàn bộ thời gian thử nghiệm (28 ngày không nhiễm tiếp theo là nhiễm, tiếp đó là 21 ngày theo dõi sau nhiễm), cá được cho ăn tùy ý 3 lần/ngày (09:00, 14:00 và 17:00) trong tuần và hai lần/ngày (10:00 và 16:00) vào cuối tuần.

Thức ăn chuyên dùng cho cá rô phi sông Nile (A, B và C) được chế biến để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của loài này. Do đó thức ăn này chứa 30% protein và 8% chất béo. Mỗi thức ăn được sản xuất theo quy trình xác định rõ ràng. Các thành phần rắn tạo ra thức ăn được nghiền trong máy nghiền búa (Hosokawa Micron, SH1, Hà Lan) để thu được mức nghiền nhỏ hơn 200 μm . Bột thu được được trộn với chế phẩm theo giải pháp hữu ích (trong cách điều trị thứ hai) và với các thành phần lỏng, như dầu, trong thiết bị trộn kiểu cánh quạt (Mainca RM90, Tây Ban Nha). Tiếp đó hỗn hợp được làm ẩm bằng 25% nước. Sau đó thức ăn được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình ép đùn ở nhiệt độ được kiểm soát bằng thiết bị ép đùn vít kép (Italplast P55, Italia). Kích cỡ cuối của hạt thức ăn là 1,5 mm. Sau trình ép đùn, thức ăn được sấy trong lò đối lưu (OP 750-UF, LTE Scientifics, Vương quốc Anh) ở 40°C trong 6 giờ.

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung vào thức ăn trong cách điều trị (B) trong quy trình ép đùn ở liều lượng 0,1%. Chất kháng sinh, đối với một phần của nó, được bổ sung vào thức ăn trong cách điều trị (C) trong quy trình ép đùn ở liều lượng 80 mg/kg thể trọng của cá.

Sau 28 ngày nuôi trong điều kiện nêu trên, cá trong mỗi thùng bị nhiễm *Streptococcus agalactiae*.

Sự nhiễm thử nghiệm được thực hiện bằng cách nhúng chìm trực tiếp trong thùng nuôi dùng cho cá. Sau khi ngắt hệ thống tuần hoàn, thể tích cố định 50 ml môi trường nuôi

24 giờ chứa *Streptococcus agalactiae* ở mật độ 10^9 CFU/ml được bổ sung vào mỗi thùng 100 l. Cá ở lại trong hệ thống khép kín trong 1 giờ, và tiếp đó sự tuần hoàn được bắt đầu lại. Sự nhiễm diễn ra tự nhiên từ cá sang cá bởi sự tiếp xúc đơn giản. Mục đích của thử nghiệm nhiễm là để thu được giá trị tối thiểu bằng 30% tỷ lệ tử vong trong khoảng thời gian 3 tuần sau nhiễm. Hệ thống ánh sáng cực tím giữa mỗi thùng khiến cho có thể giới hạn sự khuếch tán của vi khuẩn gây bệnh và do đó giới hạn sự nhiễm chéo.

Tỷ lệ tử vong được theo dõi trong 21 ngày. Cá chết được lấy hàng ngày ra khỏi mỗi thùng. Trong thời gian này, cá tiếp tục được nuôi với cùng một cách điều trị như nêu trên.

Kết quả tỷ lệ tử vong (Fig.2) cho thấy rằng, 21 ngày sau khi tiêm chủng tác nhân gây bệnh *Streptococcus agalactiae*, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng ở mức 0,1% thức ăn làm tăng đáng kể sức kháng của cá rô phi con sông Nile với tác nhân gây bệnh. Các kết quả cũng cho thấy rằng mức giảm tỷ lệ tử vong được thấy với chế phẩm là gần bằng mức giảm tỷ lệ tử vong được thấy với chất kháng sinh, có thấp hơn một chút. Bởi vậy, tỷ lệ tử vong được giảm $8,7 \pm 4\%$ so với việc điều trị mà không được thực hiện với chế phẩm bất kỳ. Đối với amoxycilin, chất này làm giảm tỷ lệ tử vong bằng $15,3 \pm 7\%$ so với việc điều trị mà không được thực hiện với chế phẩm bất kỳ.

C - Nuôi tôm

Đối với tôm trắng (*Penaeus vannamei*), hậu ấu trùng được lấy ở giai đoạn 5 (PL5) được phân bố trong bể nuôi bằng thủy tinh dung tích 100 l ở tỷ lệ 1000 con/bể nuôi trong mỗi trường hợp. Nước có độ mặn 25‰, nhiệt độ $27 \pm 1^\circ\text{C}$, và được thay thế hàng ngày ở tỷ lệ 20% tổng thể tích.

5 cách điều trị được áp dụng: (A) thức ăn chuyên dùng cho tôm trắng mà không được bổ sung và không được làm cho nhiễm, (B) thức ăn chuyên dùng cho tôm trắng mà không được bổ sung và được làm cho nhiễm, (C) thức ăn chuyên dùng cho tôm trắng mà được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp phòng ngừa ở mức 0,1% thức ăn và được làm cho nhiễm, (D) thức ăn chuyên dùng cho tôm trắng mà được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp phòng ngừa ở mức 0,3% thức ăn và được làm cho nhiễm, và (E) thức ăn chuyên dùng cho tôm trắng mà được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp phòng ngừa ở mức 0,5% thức ăn và được làm cho nhiễm.

Trong toàn bộ thời gian thử nghiệm (20 ngày không nhiễm tiếp theo là nhiễm, tiếp đó là 14 ngày theo dõi sau nhiễm), hậu ấu trùng tôm được cho ăn 5 lần/ngày (07:00, 11:00, 15:00, 19:00, và 23:00).

Thức ăn chuyên dùng cho tôm trắng (A, B, C, D và E) là thức ăn thương mại thích ứng với giai đoạn hậu ấu trùng của tôm trắng ở dạng hạt nén có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 100 μm đến 400 μm , phụ thuộc vào tuổi của hậu ấu trùng.

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung vào thức ăn trong cách điều trị (C) sau quy trình nén hạt ở liều lượng 0,1%. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung vào thức ăn trong cách điều trị (D) sau quy trình nén ở liều lượng 0,3%. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung vào thức ăn trong cách điều trị (D) sau quy trình nén ở liều lượng 0,5%. Lượng chế phẩm ở dạng bột, tương đương với 0,1%, 0,3%, hoặc 0,5% thức ăn, được pha loãng trong nước theo tỷ lệ bột:nước tương ứng bằng 1:60, 1:20, và 1:12, và tiếp đó được phun trực tiếp lên bề mặt của thức ăn bằng cách sử dụng cần phun. Nếu cần, sau đó các hạt được phủ bằng dầu động vật hoặc dầu thực vật để ngăn không cho chế phẩm tạo muối khi ở trong nước nuôi tôm.

Sau 20 ngày nuôi trong điều kiện nêu trên, tôm trong mỗi thùng, ngoại trừ thùng tiếp nhận cách điều trị (A), bị nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*, vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm.

Sự nhiễm thử nghiệm được thực hiện bằng cách nhúng chìm trực tiếp vào các thùng nuôi tôm. Dung dịch vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ở mật độ 10^6 CFU/ml được bổ sung vào mỗi thùng 100 l. Sự nhiễm diễn ra một cách tự nhiên từ hậu ấu trùng sang hậu ấu trùng bởi sự tiếp xúc đơn giản.

Tỷ lệ tử vong được theo dõi trong 14 ngày. Tôm chết được loại bỏ hàng ngày ra khỏi mỗi thùng. Trong thời gian này, tôm tiếp tục được nuôi với các cách điều trị như nêu trên.

Kết quả tỷ lệ tử vong (Fig.3) cho thấy rằng, 14 ngày sau khi tiêm chủng tác nhân gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng ở mức 0,1%, 0,3%, hoặc 0,5% thức ăn làm tăng đáng kể sức kháng của hậu ấu trùng tôm với tác nhân gây bệnh. Bởi vậy, tỷ lệ tử vong được giảm lần lượt 42%, 54%, và 57%, so với cách điều trị nhiễm mà không được thực hiện với chế phẩm bất kỳ. Kết quả tỷ lệ tử vong dưới

dạng hàm của liều lượng cũng thể hiện hệ số đáp ứng bậc hai, thể hiện rằng mặc dù 0,1% là liều lượng hiệu quả, nhưng 0,5% không tốt hơn 0,3%, và do đó liều sau được xem là tối ưu ở tôm. Đối với tôm không bị nhiễm, chúng có tỷ lệ tử vong thấp nhỏ hơn 10%, mà được xem là tự nhiên trong các điều kiện nuôi này.

Ví dụ 6 – Nghiên cứu sinh lý

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng dưới dạng phương pháp để ngăn ngừa các bệnh do vi khuẩn trong việc nuôi trồng thủy sản. Cách điều trị dự phòng của sản phẩm là do sự hoạt hóa các thông số kháng vi khuẩn trong máu của cá trước khi nhiễm tác nhân gây bệnh, cho phép cá tăng sức kháng của chúng ở thời điểm tại đó tác nhân gây bệnh xuất hiện trong môi trường mà không tác động thực sự đến việc đếm máu cơ bản.

Sau 28 ngày thử nghiệm, trong đó cá vược con châu Âu được nuôi bằng (A) thức ăn chuyên dùng cho cá vược châu Âu mà không được bổ sung hoặc (B) thức ăn chuyên dùng cho cá vược châu Âu được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp phòng ngừa ở mức 0,1% thức ăn, 4 cá được chọn cho một thùng, và tiếp đó được gây mê trong 1000 ppm 2-phenoxyetanol. Sau đó, mẫu thử máu được lấy. Hai phần phân ước của máu tươi được đồng nhất hóa để đo hoạt tính kháng vi khuẩn có trong khoang, tức là hoạt tính lysozym, sự bùng nổ trong đường tiêu hóa, hoạt tính kháng vi khuẩn, và các thông số huyết học. Hai phần phân ước khác được ly tâm ở 8000 g trong 10 phút ở 4°C để thu được huyết tương. Ngay sau khi thu gom máu, các kính phết được lấy, được sấy và tiếp đó được nhuộm màu bằng chất nhuộm màu Wright (Hematocolor, Merck) và tiếp đó được cố định bằng formol-ethanol (10% formaldehyt: 37% etanol tuyệt đối).

Profin máu có các thông số sau: hematocrit, tương ứng với thể tích chiếm bởi hồng cầu trong tổng thể tích máu, biểu thị theo %. Phương pháp này bao gồm bước nạp máu vào ống mao dẫn, tiếp đó bịt kín một trong số các đầu của ống bằng các mẫu nhỏ chất dẻo platixin, và tiếp đó ly tâm ống trong 10 phút ở 8000 g. Sau bước này, tỷ lệ phần trăm tương đối của tế bào hồng cầu (RBC: red blood cell) có thể được tính. Hemoglobin (Hb) được đo bằng cách sử dụng phương pháp đo màu. Từ hai thông số này (RBC và Hb), một số thông số khác được tính. Thể tích trung bình của hồng cầu (MCV: mean corpuscular volume) tương ứng với công thức $(\text{hematocrit (\%)} / \text{RBC (10}^6 \mu\text{l)}) \times 10$ và lượng hemoglobin trung

binh trong hồng cầu (MCH: mean corpuscular hemoglobin) tương ứng với công thức $(\text{hemoglobin (g dl)} / \text{RBC (10}^6 \mu\text{L)}) \times 10$.

Tế bào bạch cầu chứa trong máu được đếm bằng cách pha loãng theo tỷ lệ 1/20 của máu đã làm đồng nhất trong dung dịch nước muối Hank chứa heparin (30 đơn vị/ml). Hồng cầu chứa trong máu được đếm, đối với phần của chúng, sau khi pha loãng theo tỷ lệ 1/200 trong dung dịch nước muối Hank chứa heparin (30 đơn vị/ml). Tiếp đó việc đếm được thực hiện bằng cách sử dụng buồng Neubauer. Mật độ của tế bào hồng cầu và bạch cầu được biểu thị lần lượt bởi 10^4 tế bào/ μL và 10^6 tế bào/ μL .

Trong số các cơ chế bảo vệ miễn dịch của vật chủ, sự thực bào được quan sát, mà được đi kèm với sự giải phóng đột ngột của các phân tử oxy phản ứng, thường được gọi là sự bùng nổ trong đường tiêu hóa. Tiến hành đo trên bạch cầu trong máu của cá được lấy khi kết thúc 28 ngày thử nghiệm. 4 μL máu tươi được pha loãng trong 96 μL dung dịch nước muối Hank chứa heparin (30 đơn vị/ml) và được đưa vào các lỗ của vi đĩa 96 lỗ với 100 μL huyền phù luminol (2 mM luminol trong 0,2 M dung dịch đệm borat ở độ pH 9,0, với 2 $\mu\text{g/ml}$ phorbol myristat axetat, Sigma) trong 2 giờ ở 25°C . Mỗi mẫu thử so với mẫu trắng mà mẫu thử máu không được bổ sung vào. Sự phát quang hóa học được tạo ra bởi luminol được đo cứ mỗi 3 phút bởi bộ đọc phát quang (Synergy HT, Biotek) để tạo ra các đường cong động lực. Mỗi mẫu thử được đo trong 3 nhóm giống nhau và sự phát quang tương đối biểu thị theo đơn vị ánh sáng tương đối (RLU: relative light unit).

Lysozym là phân tử liên quan đến cơ chế bảo vệ của vật chủ. Lysozym được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm đo độ đục. Dung dịch *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg/ml trong dung dịch đệm phosphat 0,05 M ở độ pH 6,2) được chuẩn bị trong vi đĩa. 15 μL huyết tương và 250 μL dung dịch nêu trên được trộn để tạo ra thể tích cuối 265 μL . Phản ứng phân giải vi khuẩn được thực hiện ở 25°C , ở mức hấp thụ 450 nm. Mức hấp thụ này được đọc sau 0,5 và 4,5 phút trong bộ đọc vi đĩa từ Synergy HT. Dung dịch lysozym lòng trắng trứng đã khô lạnh (Sigma) được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat 0,05 M ở độ pH 6,2 để tạo ra đường cong chuẩn. Tỷ lệ lysozym của mẫu thử máu được thấy sau khi sử dụng công thức rút ra từ đường cong chuẩn.

Hoạt tính diệt khuẩn chứa trong máu của cá được đo bằng cách sử dụng chủng

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* PP3. Vi khuẩn được nuôi cấy trong 48 giờ ở 25°C trong môi trường nuôi cấy TSA (TSA: tryptic soy agar; Difco Laboratoires) và tiếp đó được cấy trong môi trường TSB (TSB: tryptic soy broth; Difco Laboratoires), mỗi trong số hai môi trường này được bổ sung NaCl ở nồng độ cuối 1% (khối lượng/thể tích). Vi khuẩn cấy trong môi trường TSB tiếp đó được nuôi cấy trong 24 giờ ở 25°C trong sự khuấy không đổi ở 100 rpm. Vi khuẩn trong giai đoạn phát triển theo số mũ được thu gom bằng cách ly tâm ở tốc độ 3500 g trong 30 phút và tiếp đó được tái tạo huyền phù trong dung dịch nước muối Hank chứa heparin (30 đơn vị/ml). Mật độ của chúng được điều chỉnh đến 10^6 CFU/ml. 20 µl huyết tương được bổ sung vào các lỗ của vi đĩa 96 lỗ. Dung dịch nước muối Hank chứa heparin (30 đơn vị/ml) được sử dụng làm mẫu đối chứng. 20 µl của chủng PP3 ở 10^6 CFU/ml được bổ sung vào mỗi lỗ và tiếp đó được nuôi cấy ở 25°C trong 2,5 giờ. 25 µl 3-(4,5 dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoli bromua (1 mg/ml, Sigma) được bổ sung vào mỗi lỗ và tiếp đó được nuôi cấy ở 25°C trong 10 phút để cho phép tạo ra formazan. Tiếp đó, các vi đĩa được ly tâm ở tốc độ 2000 g trong 10 phút và chất lắng được hòa tan trong 200 µl dimethyl sulfoxit (Sigma). Mức hấp thụ formazan hòa tan được đo ở 560 nm. Hoạt tính diệt khuẩn được biểu thị theo %, dựa vào chênh lệch giữa vi khuẩn sống sót và số vi khuẩn trong mẫu đối chứng.

Sau 28 ngày cho ăn, phần lớn các thông số máu (xem bảng 4) liên quan đến hồng cầu và hemoglobin vẫn không thay đổi, bất kể phương thức cho ăn (A hoặc B). Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng ở mức 0,1% thức ăn không làm thay đổi đáng kể các thông số sinh lý cơ bản. Trái lại, chế phẩm làm tăng tế bào bạch cầu được tạo ra trong sự miễn dịch, cho dù sự tăng này không là đáng kể về mặt thống kê. Đồng thời, sự bùng nổ trong đường tiêu hóa, lysozym và hoạt tính kháng vi khuẩn của tế bào bạch cầu được hoạt hóa đáng kể bởi chế phẩm và mức tăng tỷ lệ phần trăm của nó so với mẫu đối chứng lần lượt là 39%, 25%, và 8%. Sự hoạt hóa rộng hệ thống miễn dịch bẩm sinh này làm tăng sức mạnh cho cá khi áp lực gây bệnh xuất hiện, và khiến cho có thể hiểu các cơ chế liên quan đến việc ứng dụng chế phẩm.

Bảng 4. Bảng 4 thể hiện các thông số máu và các thông số kháng vi khuẩn được thấy ở cá vược con châu Âu *Dicentrarchus labrax*, 28 ngày sau nuôi và trước khi nhiễm chủng *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* PP3, phụ thuộc vào cá không được bổ

sung (A) chế phẩm theo giải pháp hữu ích hoặc chế phẩm được áp dụng ở mức 0,1% (B).

Thông số		(A)	(B)
Hematocrit	%	22,6	19,3
Hemoglobin	g/dl	1,3	1
Thể tích trung bình của hồng cầu	μm^3	120,7	108
Lượng hemoglobin trung bình trong hồng cầu	pg/tế bào	6,7	5,8
Tế bào hồng cầu	$\times 10^6 \mu\text{l}$	1800000	1900000
Tế bào bạch cầu	$\times 10^4 \mu\text{l}$	47000	61000
Sự bùng nổ trong đường tiêu hóa	RLU	615	855
Lysozym	$\mu\text{g/ml}$	2,8	3,5
Hoạt tính diệt khuẩn	%	19	28

Ví dụ 6 – Thử nghiệm tác dụng điều trị

Trong trường hợp thứ hai, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng dưới dạng phương pháp điều trị các bệnh vi khuẩn trong việc nuôi trồng thủy sản.

Thử nghiệm trong điều kiện nuôi tự nhiên đối với cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*) bị nhiễm *Streptococcus spp* mà gây ra bệnh do liên cầu khuẩn.

Cá rô phi con sông Nile có kích cỡ đồng đều và không có dấu hiệu bất kỳ của bệnh hoặc sự dị dạng được làm thích nghi với môi trường trong 4 tuần với thức ăn thương mại 1,5 mm cho đến khi chúng đạt đến trọng lượng ban đầu 10 g/cá để chuẩn bị cho thử nghiệm thương mại. Tiếp đó các cá con này được phân bố đồng nhất, phụ thuộc vào trọng lượng của chúng, giữa 12 lồng dung tích 12m^3 (2,5 x 25 x 2,0 m).

Sau sự xuất hiện bệnh do vi khuẩn liên quan đến *Streptococcus spp*, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được áp dụng theo hai chế độ sử dụng: 8 ngày hoặc 14 ngày.

3 cách điều trị được áp dụng: (A) thức ăn thương mại chuyên dùng cho Cá rô phi sông Nile mà không được bổ sung, (B) thức ăn thương mại chuyên dùng cho Cá rô phi sông Nile được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp điều trị ở mức 0,4% thức ăn trong 8 ngày sau bệnh xuất hiện, và (C) thức ăn thương mại chuyên dùng cho Cá rô phi sông Nile mà được bổ sung chế phẩm được áp dụng dưới dạng biện pháp điều trị ở mức 0,4% thức ăn trong 14 ngày sau khi bệnh xuất hiện. Mỗi cách điều trị được áp dụng với 4 lồng/cách điều trị. Mỗi lồng chứa 300 cá.

Thẻ trọng từ 10 đến 200 g, thì cá được cho ăn tùy ý 3 lần/ngày (08:00, 12:00, và 17:00). Thẻ trọng từ 200 đến 600 g, thì cá được cho ăn tùy ý hai lần/ngày (08:00 và 17:00).

Thức ăn chung dùng cho cá rô phi sông Nile (A, B và C) là thức ăn nuôi trồng thủy sản như nêu trên trong ví dụ 1 và được chế biến để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của loài này trong toàn bộ chu kỳ nuôi.

Khi bệnh đã xuất hiện, chế phẩm theo giải pháp hữu ích được bổ sung dưới dạng biện pháp điều trị vào thức ăn của các cách điều trị (B và C) trực tiếp vào các hạt ép đùn và ở liều lượng 0,4%. Lượng chế phẩm ở dạng bột, tương đương với 0,4% thức ăn, được pha loãng trong nước theo tỷ lệ bột:nước bằng 1:15, và tiếp đó được phun trực tiếp lên bề mặt của thức ăn bằng cách sử dụng cần phun. Nếu cần, sau đó các hạt được phủ bằng dầu động vật hoặc dầu thực vật để ngăn không cho chế phẩm tạo muối khi ở trong nước nuôi cá.

Sau giai đoạn nhiễm liên quan đến *Streptococcus spp* và áp dụng chế phẩm với hai chế độ sử dụng khác nhau, kết quả tỷ lệ tử vong cho thấy rằng việc áp dụng ở mức 0,4% trong 8 ngày (B) làm giảm tỷ lệ tử vong 20% so với mẫu đối chứng không có chế phẩm (A). Mức giảm tỷ lệ tử vong là 40% đối với cách điều trị được thực hiện với chế phẩm ở 0,4% trong 14 ngày (C). Sự phát triển cải thiện sau bệnh về mặt tăng trọng lượng và chỉ số biến đổi cũng được quan sát phụ thuộc vào liệu chế phẩm được áp dụng trong 8 ngày (B) hoặc 14 ngày (C). Bởi vậy, sinh khối cuối của các cách điều trị B và C được gia tăng lần lượt bằng 55,2% và 117% so với A; chỉ số biến đổi của các cách điều trị B và C được tối ưu hóa lần lượt bằng 32,5% và 47,5% so với A.

Các kết quả (bảng 3 dưới đây) xác nhận rằng chế phẩm theo giải pháp hữu ích có tác dụng điều trị sau tối thiểu 8 ngày áp dụng, nhưng hiệu quả chống lại tác nhân gây bệnh là tối ưu sau 14 ngày áp dụng.

Bảng 3. Bảng 3 thể hiện tỷ lệ tử vong và các thông số phát triển (sinh khối cuối, kg, và chỉ số biến đổi) được thấy ở cá rô phi con sông Nile *Oreochromis niloticus* sau khi nhiễm *Streptococcus spp*, phụ thuộc vào liệu cá không được bổ sung (A) bằng chế phẩm theo giải pháp hữu ích hay không hoặc liệu chế phẩm này được áp dụng ở mức 0,4% trong 8 ngày (B) hoặc 14 ngày (C) sau khi bệnh xuất hiện hay không.

	(A)	(B)	(C)
Tỷ lệ sống (%)	30	50	70
Sinh khối cuối (kg)	210	326	456
Chỉ số biến đổi	4	2,7	2,1

Ví dụ 7 – Thử nghiệm in vitro

Hoạt tính kháng vi khuẩn của chế phẩm theo giải pháp hữu ích được thử nghiệm bằng cách đo nồng độ ức chế tối thiểu biểu thị theo phần triệu (ppm) đối với 10 tác nhân gây bệnh vi khuẩn dưới nước. Vi khuẩn nước mềm được tạo ra bởi *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiellatarda* và *Yersinia ruckeri*, trong khi vi khuẩn nước biển hoặc nước lợ được tạo ra bởi *Aeromonas salmonicidasalmonicida*, *Photobacterium damseladamsela*, *Streptococcus iniae*, *Tenacibaculummaritimum*, *Tenacibaculum discolor*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, và *Vibrio anguillarum*.

Chế phẩm (A), được tạo ra bởi nhóm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích cũng như 4 sản phẩm tự nhiên được công nhận là có khả năng kháng vi khuẩn: (B) xitrala, mà là thành phần chính của dầu sả và các dầu từ các cây khác của loại *Cymbopogon*, (C) eugenol, thành phần chính của đinh hương, (D) carvacrol, thành phần chính của dầu xạ hương và dầu kinh giới, và (E) alixin nguyên chất, hợp chất lưu huỳnh hữu cơ dư thừa trong các loại thuộc họ hành và có chế phẩm $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{-SOS-CH}_2\text{CH=CH}_2$ được công nhận dạng dưới dạng hoạt chất mà tương đương phần lớn với các hoạt chất được mô tả trong chế phẩm (A), được cho vào dung dịch trong nước cất và được pha loãng liên tiếp trong nước cất trực tiếp trong các lỗ của vi đĩa 96 lỗ. 100 μl môi trường nuôi vi khuẩn đích với lượng gồm 10^6 đơn vị tạo thành cụm khuẩn/ml (CFU/ml) được bổ sung vào mỗi lỗ trong vi đĩa ở thời điểm cấy. Tiếp đó, vi đĩa được nuôi cấy trong 24 giờ ở 25°C . Tiếp đó nồng độ ức chế tối thiểu được tính bằng cách quan sát các lỗ mà thể hiện và không thể hiện sự phát triển vi khuẩn dưới dạng hàm của liều lượng của chế phẩm hoặc sản phẩm kết hợp. Nồng độ ức chế tối thiểu càng thấp thì sản phẩm càng hiệu quả hơn, vì cần đến sản phẩm ít hơn để tạo ra sự ức chế tác nhân gây bệnh.

Sau 24 giờ nuôi cấy, các kết quả (bảng dưới đây) cho thấy rằng chế phẩm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích có nồng độ ức chế tối thiểu thấp nhất, phụ

thuộc vào chủng tác nhân gây bệnh, nằm trong khoảng từ 16 đến 125 ppm, so với từ 64 đến 1000 ppm đối với sản phẩm B, so với từ 64 đến 2000 ppm đối với sản phẩm C, so với từ 32 đến 250 ppm đối với sản phẩm D, và so với ít nhất 4000 ppm đối với sản phẩm E. Các giá trị này cho thấy rằng hiệu quả kháng vi khuẩn khác biệt phụ thuộc vào các sản phẩm thử nghiệm và rằng hiệu quả kháng vi khuẩn của chế phẩm theo giải pháp hữu ích là tốt nhất khi so sánh với các sản phẩm kháng khuẩn khác. Ngoài ra, khi so sánh với sản phẩm tương tự, như alixin, hiệu quả kháng vi khuẩn của các hoạt chất được mô tả theo giải pháp hữu ích tốt hơn đáng kể.

Bảng dưới đây thể hiện nồng độ ức chế tối thiểu (biểu thị theo ppm) đối với 10 chủng tác nhân gây bệnh của chế phẩm theo giải pháp hữu ích so với 4 sản phẩm được công nhận là kháng khuẩn. (A) Chế phẩm được tạo ra bởi nhóm gồm 8 thành phần được mô tả theo giải pháp hữu ích, (B) xitrala, (C) eugenol, (D) carvacrol, và (E) alixin nguyên chất.

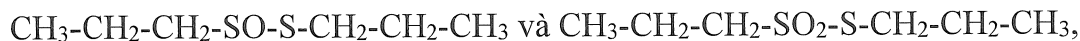
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	64	250	250	250	>4000
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	125	1000	500	250	>4000
<i>Photobacterium damsela</i>	32	500	1000	125	>4000
<i>Streptococcus iniae</i>	125	500	1000	64	>4000
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	16	64	64	32	>4000
<i>Tenacibaculum discolor</i>	16	64	125	64	>4000
<i>Vibrio harveyi</i>	64	1000	1000	250	4000
<i>Vibrio alginolyticus</i>	125	1000	2000	250	4000
<i>Vibrio anguillarum</i>	16	500	1000	64	4000
<i>Yersinia ruckeri</i>	125	1000	500	250	>4000

Giải pháp hữu ích không chỉ giới hạn ở các phương án được mô tả ở đây, và các phương án khác sẽ được thấy rõ với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm chứa:

- các hợp chất có công thức:



và

- ít nhất một chất nền vô cơ,

các hợp chất này chiếm 15 % khối lượng dựa trên khối lượng của hỗn hợp gồm các hợp chất này và ít nhất một chất nền vô cơ này.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chất nền vô cơ là silic oxit.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các hợp chất này chiếm 0,003 % khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

4. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó các hợp chất này chiếm 0,009 % khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó các hợp chất này có tỷ lệ tương đối theo khối lượng trong khoảng từ 60/40 đến 40/60.

6. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, chứa:

- a. hỗn hợp của các hợp chất và ít nhất một chất nền vô cơ với lượng 20 % khối lượng,
- b. các hợp chất cho phép chế phẩm có độ ổn định và có khả năng phân tán trong nước với lượng từ 40 đến 61 % khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm, và
- c. các hợp chất kích thích miễn dịch với lượng từ 19 đến 40 % khối lượng.

1/2

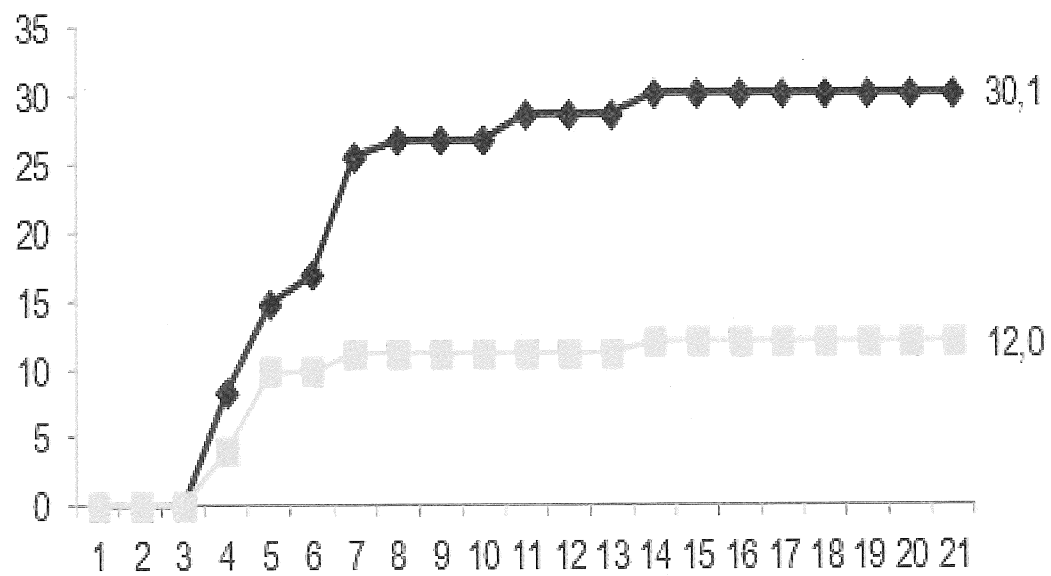


Fig.1

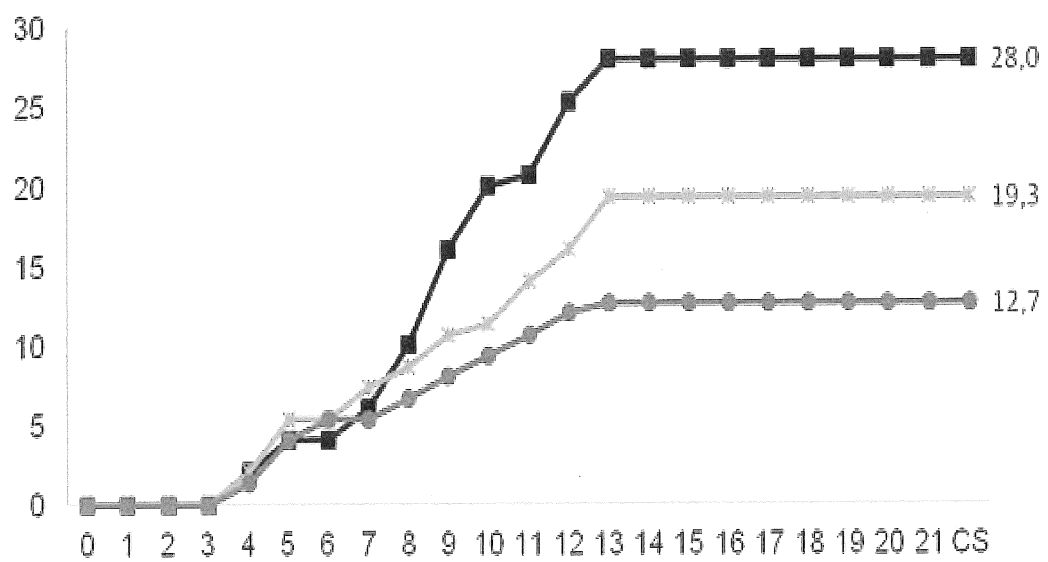


Fig.2

2/2

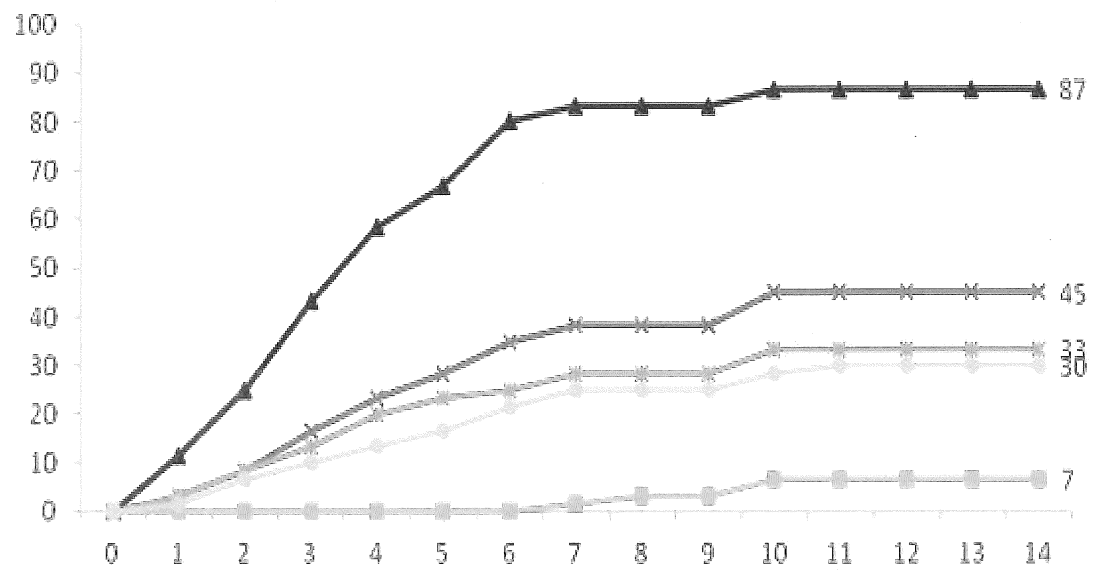


Fig.3