



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0041012

(51)<sup>7</sup> A01K 61/13; A01P 7/00; A01P 15/00; (13) B  
A01M 1/20; A01N 59/00

(21) 1-2016-01732

(22) 17/10/2014

(86) PCT/JP2014/077645 17/10/2014

(87) WO2015/056769 23/04/2015

(30) 2013-217648 18/10/2013 JP

(45) 26/08/2024 437

(43) 25/08/2016 341A

(73) 1. Nissui Corporation (JP)

3-1, Nishi-shinbashi 1-chome, Minato-ku, Tokyo 1058676, Japan

2. KYORITSU SEIYAKU CORPORATION (JP)

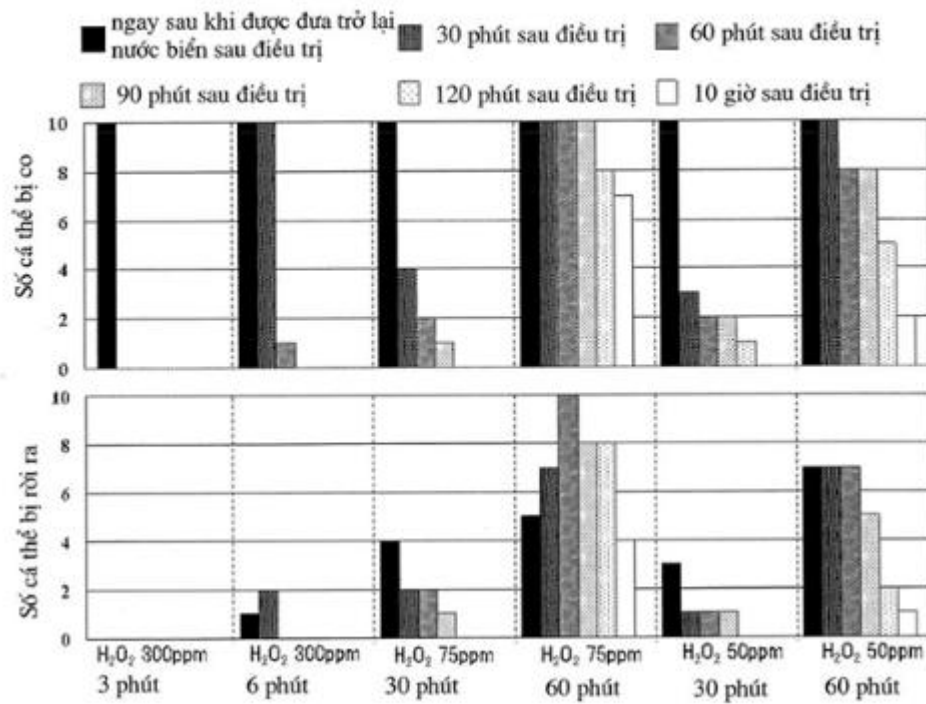
1-11-5 Kudankita, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

(72) HIRAZAWA Noritaka (JP); KAWAKAMI Kazuo (JP); HASEGAWA Satoshi (JP);  
TAKANO Ryoko (JP); TSUBONE Shiori (JP).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP LOẠI BỎ NGOẠI KÝ SINH TRÙNG SỐNG TRÊN CÁ BIỂN  
BẰNG CÁCH SỬ DỤNG DUNG DỊCH NƯỚC HYĐRO PEROXIT CÓ NỒNG ĐỘ  
THẤP

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp an toàn hơn và hữu hiệu hơn để loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên bề mặt cơ thể cá. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên cá biển bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp, trong đó cá này được ngâm trong dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm trong thời gian ít nhất 15 phút. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên cá biển bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp, trong đó các mặt của lưới lồng được bao quanh bằng tấm ngăn để tạo ra khu vực giữ nước biển bên trong, dung dịch nước hydro peroxit này được nạp vào nước biển trong lồng với lượng sao cho nồng độ trung bình theo tính toán nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm, và sau thời gian ít nhất 15 phút, tấm ngăn này được lấy ra.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

[0001] Sáng chế đề cập đến chất dùng để loại bỏ ngoại ký sinh trùng (vật ký sinh ngoài) sống trên cá biển (đặc biệt là cá nuôi) và phương pháp loại bỏ ký sinh trùng này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hoá chất và phương pháp loại bỏ sự lây nhiễm sán lá đơn (*Monogenea*) như ký sinh trùng sống trên da cá và ký sinh trùng sống trong mang cá mà sống ký sinh trên bề mặt cơ thể của cá.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

[0002] Trong ngành nuôi cá, bệnh ký sinh trùng là một vấn đề nghiêm trọng vì nó ngăn cản sản xuất ổn định. Mặc dù có rất nhiều loại ký sinh trùng, sán lá đơn chủ (*Platyhelminthes*: *Monogenea*) và rận cá (*Arthropoda*: *Crustacea*) lây nhiễm rất nhiều loại cá nuôi và gây ra sự nhiễm bệnh là một trong số các vấn đề lớn nhất trong nuôi trồng thủy sản. Sán lá đơn chủ bao gồm hai nhóm có tên chung là, tức là, ký sinh trùng sống trên da cá và ký sinh trùng sống trong mang cá. Ký sinh trùng sống trên da cá bao gồm *Neobenedenia girellae* (*Monopisthocotylea*: *Capsalidae*) và *Benedenia seriola* (*Monopisthocotylea*: *Capsalidae*) và sống ký sinh trên nhiều loài cá bao gồm các loài *Seriola* như cá bò biển lớn (*Seriola dumerili*), cá trác sọc vàng (yellowtail) (*Seriola quinqueradiata* (buri)), cá bò biển sọc vàng (*Seriola lalandi*), và cá trác Almaco (*Seriola rivoliana*), cũng như cá trác có sọc (*Pseudocaranx dentex*), cá mú Nhật (*Lateolabrax japonicus*), cá tráp đỏ (*Pagrus major*), cá Yellow tang (*Zebrasoma flavescens*), cá song chấm đỏ (*Epinephelus akaara*), cá song răng dài (*Epinephelus bruneus*), cá bơn Nhật (*Paralichthys olivaceus*), cá nóc hổ (*Takifugu rubripes*), và cá bớp (*Rachycentron canadum*). Các phát hiện chẩn đoán tại hiện trường bao gồm cá chết với các triệu chứng khác nhau như xuất huyết da ở phần bụng, vây cá bị mòn, và mất đục; ngoài ra, khi có nhiều ký sinh trùng trên bề mặt cơ thể của cá trở nên nhầy do sự sản sinh dịch nhầy quá mức. Khả năng thường thấy khác là sự bơi lội thất thường và cọ vào lưới lồng nuôi. Việc cọ vào lưới lồng nuôi làm xấu thêm các triệu chứng và khả

năng lây nhiễm tác nhân gây bệnh thông qua vị trí ký sinh gia tăng, đôi khi khiến cho tổn thương lan rộng. Nếu xác nhận ký sinh trùng có nhiễm trên da cá, chúng được loại bỏ bằng cách ngâm trong dung dịch nước ngọt hoặc bể dung dịch hydro peroxit có nồng độ cao, trong thời gian khoảng 3 phút với nhiệt độ nước được kiểm soát một cách cẩn thận.

[0003] Sán lá đơn chủ được gọi là ký sinh trùng sống trong mang cá bao gồm: *Heteraxine heterocerca* và *Zeuxapta japonica*, cả hai đều nằm trong họ Heteraxine (Platyhelminthes: Polypisthocotylea) và sống ký sinh trên các loài *Seriola*; *Bivagina tai* trong họ Microcotyloidea (Platyhelminthes: Polypisthocotylea) và sống ký sinh trên *Pagrus major*; *Microcotyle sebastis* trong họ Microcotyloidea (Platyhelminthes: Polypisthocotylea) và sống ký sinh trên *Sebastes schlegeli*; *Microcotyle sebastisci* cùng họ này và sống ký sinh trên *Sebastiscus marmoratus*; *Heterobothrium okamotoi* trong họ Diclidophoridae (Platyhelminthes: Polypisthocotylea) và sống ký sinh trên *Takifugu rubripes*; và *Neoheterobothrium hirame* trong cùng họ này và sống ký sinh trên *Paralichthys olivaceus*. Các phát hiện chẩn đoán tại hiện trường bao gồm sự đổi màu của mang cá, cá bị bệnh thiếu máu, và chỉ số khối cơ thể giảm. Khả năng thường thấy khác là sự bơi lội thất thường và cọ vào lưới lồng nuôi. Việc cọ vào lưới lồng nuôi làm xấu thêm các triệu chứng và khả năng lây nhiễm tác nhân gây bệnh thông qua vị trí ký sinh gia tăng, đôi khi khiến cho tổn thương lan rộng. Nếu xác nhận ký sinh trùng có nhiễm trên da cá, chúng được loại bỏ bằng cách ngâm trong dung dịch nước ngọt hoặc bể dung dịch hydro peroxit có nồng độ cao, trong thời gian khoảng 3 phút với nhiệt độ nước được kiểm soát một cách cẩn thận.

Trong cả hai trường hợp, cần đến công sức bổ sung và cá phải chịu stress lớn trong khi chúng được chuyển đến cơ sở điều trị, và nếu không phải được điều trị; do đó, mong muốn có các phương pháp điều trị thuận tiện hơn.

Trong những năm gần đây, đôi khi đã nhận thấy rằng quần thể lớn *Lamellodiscus* spp. ký sinh trong mang cá *Pagrus major* nuôi, gây ra mối lo ngại về sự tác động tiềm tàng đến vật chủ. Cũng gọi là ký sinh trùng sống trong mang cá, ký sinh trùng này được phân loại thuộc giống *Lamellodiscus* (Monopisthocotylea:

Diplectanidae). Hiện vẫn chưa có một phương pháp hữu hiệu được đề xuất để loại bỏ ký sinh trùng này.

[0004] Ký sinh trùng được gọi là rận cá (Arthropoda: Crustacea) bao gồm, ví dụ, *Caligus longipedis* sống ký sinh trên *Pseudocaranx dentex*, *Pseudocaligus fugu* sống ký sinh trên cá nóc hồ, và *Caligus orientalis* sống ký sinh trên cá thuộc họ cá hồi cũng như *Mugil cephalus* sống ký sinh trên cá rô phi. Các phát hiện chẩn đoán tại hiện trường cũng như sự tác động đến cá có ký sinh trùng và phương pháp loại bỏ ký sinh trùng là như được mô tả trên đây đối với ký sinh trùng sống trên da cá, chỉ khác là thời gian điều trị trong bể nước ngọt hoặc bể dung dịch nước hydro peroxit để loại bỏ ký sinh trùng là khoảng 20 phút, lâu hơn thời gian cần thiết để loại bỏ ký sinh trùng sống trên da cá.

[0005] Các loài ký sinh trùng sống trên da cá của các loài cá *Seriola*, là *Benedenia seriolae* và *Neobenedenia girellae*. *Neobenedenia girellae* cũng được thông báo là sống ký sinh trên nhiều loài cá biển, ngoài loài cá *Seriola*. Các phương pháp tại hiện trường để loại bỏ ký sinh trùng này chủ yếu dựa vào việc ngâm trong dung dịch Hóa chất bằng cách sử dụng dung dịch hydro peroxit (MARINE SOUR, nhãn hiệu của KATAYAMA CHEMICAL, INC. và SAKANA GUARD, nhãn hiệu của HODOGAYA CHEMICAL CO., LTD.) hoặc trong bể nước ngọt. Ở Nhật, dung dịch hydro peroxit được phê chuẩn làm thuốc thú y để diệt ký sinh trùng *Benedenia seriolae* trên cá thuộc bộ Perciformes và diệt *Bivagina tai* (ký sinh trùng sống trong mang cá) ký sinh trên *Pagrus major*. Liều lượng và cách dùng được quy định để loại bỏ các ký sinh trùng này là sao cho chúng được cho tiếp xúc với dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ 300ppm trong thời gian 3 phút. Trong việc nuôi cá *Seriola dumerili*, *Neobenedenia girellae* gây thiệt hại nghiêm trọng hơn so với *Benedenia seriolae* và dung dịch hydro peroxit cũng được sử dụng để loại bỏ *Neobenedenia girellae* trên cá *Seriola dumerili*. Tuy nhiên, liều lượng và cách dùng nêu trên có tác dụng thấp trong việc trừ *Neobenedenia girellae* và thực tế là chúng thường được ngâm trong dung dịch  $H_2O_2$  có nồng độ 300ppm trong thời gian từ 5 đến 6 phút. Một nhược điểm tiếp theo là dung dịch hydro peroxit có độc tính cao đối với cá *Seriola dumerili* ở nhiệt độ nước cao, đôi khi khiến cho cá chết, điều này có thể được cho là do nguồn cung oxy không đủ.

Cần lưu ý rằng trong những năm gần đây, dung dịch hydro peroxit cũng được

phê chuẩn dùng làm thuốc thú y để trừ *Neobenedenia girellae* và *Pseudocaligus fugu* sống ký sinh trên cá thuộc bộ Tetraodontiformes và liều lượng và cách dùng của chúng là sao cho chúng được tiếp xúc với dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ 300ppm trong thời gian 20 phút.

[0006] Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ phương pháp loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên cá nuôi trong nước biển, trong đó cá này được ngâm trong dung dịch dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ nằm trong khoảng 200-3000ppm trong thời gian 1-20 phút. Tài liệu sáng chế 2 bộc lộ phương pháp loại bỏ *gyrodactylus* trên cá nước ngọt, trong đó cá này được ngâm trong dung dịch dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ nằm trong khoảng 10-100ppm trong thời gian 30-120 phút. Tài liệu sáng chế 3 bộc lộ phương pháp phòng ngừa cá *Takifugu rubripes* bị nhiễm *Heterobothrium* sp., trong đó cá này được ngâm trong dung dịch dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ nằm trong khoảng 400-2000ppm trong thời gian 20-120 phút.

### **Tài liệu sáng chế**

[0007] Tài liệu sáng chế 1: JPH 7-51028 B

Tài liệu sáng chế 2: Japanese Patent No. 2575240

Tài liệu sáng chế 3: Japanese Patent No. 2817753

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

[0008] Sáng chế nhằm mục đích đề xuất phương pháp an toàn hơn và hữu hiệu hơn để loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên bề mặt cơ thể cá hoặc trong mang cá.

### **Cách thức để giải quyết vấn đề**

[0009] Trong quá trình nghiên cứu phương pháp điều trị bằng cách sử dụng dung dịch nước hydro peroxit, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khi dung dịch nước hydro peroxit được sử dụng ở nồng độ thấp, không cao hơn 150ppm, thì có thể tiêu diệt ký sinh trùng mạnh hơn so với khi được sử dụng ở nồng độ cao thông thường không thấp hơn 300 ppm, nhờ đó ký sinh trùng có thể được loại bỏ một cách triệt để hơn; sáng chế đã được hoàn thành trên cơ sở phát hiện này. Khi dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ

thấp được kết hợp với phương pháp phân tán (phương pháp mà trong đó các hóa chất được phun một cách trực tiếp vào bè thả cá hoặc lồng cá và các điểm nuôi cá tương tự), đã tránh được hiện tượng thiếu oxy thường đi kèm với phương pháp hiện có là điều trị bằng dung dịch dung dịch sử dụng thể tích nước biển giới hạn và có thể giảm được một cách đáng kể nhân công cho việc tập hợp cá; đây chính là sự phát hiện ra phương pháp trừ ký sinh trùng ưu việt mà lại đơn giản hơn và an toàn hơn so với các phương pháp đã biết trước đây.

Về cơ bản, sáng chế đề cập đến phương pháp loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên cá biển như được nêu dưới đây trong các mục từ (1) đến (5):

- (1) Phương pháp loại bỏ ngoại ký sinh trùng sống trên cá biển bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp, trong đó cá này được ngâm trong dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm trong thời gian ít nhất 15 phút.
- (2) Phương pháp theo (1), trong đó ít nhất các mặt của lưới lồng được bao quanh bằng tấm ngăn để tạo ra khu vực giữ nước biển bên trong, dung dịch nước hydro peroxit này được nạp vào nước biển trong lồng với lượng sao cho nồng độ trung bình theo tính toán nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm, và sau thời gian ít nhất 15 phút, tấm ngăn này được lấy ra.
- (3) Phương pháp theo (1) hoặc (2), trong đó ngoại ký sinh trùng thuộc lớp Monogenea trong ngành Platyhelminthes hoặc thuộc lớp Crustacea trong ngành Arthropoda.
- (4) Phương pháp theo (1) hoặc (2), trong đó ngoại ký sinh trùng này thuộc bộ Monopisthocotylea hoặc Polypisthocotylea trong lớp Monogenea hoặc thuộc họ Caligidae trong lớp Crustacea của ngành Arthropoda.
- (5) Phương pháp theo (1) hoặc (2), trong đó ngoại ký sinh trùng thuộc họ Capsalidae hoặc Diplectanidae trong bộ Monopisthocotylea của lớp Monogenea, họ Heteraxine, Microcotyloidea, Diclidophoridae hoặc Neoheterobothrium trong bộ Polypisthocotylea của lớp Monogenea, hoặc thuộc họ Caligidae trong lớp Crustacea của ngành Arthropoda.
- (6) Phương pháp theo (1) hoặc (2), trong đó ngoại ký sinh trùng là *Benedenia*

*seriolae*, *Benedenia epinepheli*, *Benedenia hoshinai*, *Benedenia sekii*, *Neobenedenia girellae*, *Neobenedenia congeri*, *Lamellodiscus* spp., *Zeuxapta japonica*, *Bivagina tai*, *Heteraxine heterocerca*, *Microcotyle sebastis*, *Microcotyle sebastisci*, *Heterobothrium okamotoi*, *Neoheterobothrium hirame*, *Caligus longipedis*, *Pseudocaligus fugu*, hoặc *Caligus orientalis*.

(7) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số mục từ (1) đến (6), trong đó cá thuộc bộ Perciformes.

(8) Phương pháp theo (7), trong đó cá thuộc loài *Seriola* hoặc thuộc họ *Sparidae*.

(9) Phương pháp theo (1) hoặc (2), trong đó thời gian ngâm nằm trong khoảng từ 15 phút đến 6 giờ.

(10) Phương pháp theo (1) hoặc (2), trong đó thời gian ngâm nằm trong khoảng từ 15 phút đến 2 giờ.

### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

[0010] Bằng cách sử dụng phương pháp loại bỏ theo sáng chế, ngoại ký sinh trùng có thể được loại bỏ bền vững hơn và mà không gây ra tác động bất lợi bất kỳ cho cá. Cụ thể, ngoại ký sinh trùng như *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girellae*, *Zeuxapta japonica*, *Bivagina tai*, và *Lamellodiscus* spp. gây ảnh hưởng đáng kể đến ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản có thể được loại bỏ một cách có hiệu quả.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

[0011] Fig.1 là tập hợp các đồ thị thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit đối với *Neobenedenia girellae* trong Ví dụ 1.

Fig.2 là tập hợp các ảnh chụp thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit (300ppm x 3 phút điều trị) đối với *Neobenedenia girellae* trong Ví dụ 1; A: khu đối chứng; B: ngay sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị; C: 3 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị; D: 15 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị.

Fig.3 là tập hợp các ảnh chụp thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit (300ppm x 6 phút điều trị) đối với *Neobenedenia girellae* trong Ví dụ 1; A: ngay



sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị; B: 30 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị; C: 60 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị.

Fig.4 là tập hợp các ảnh chụp thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit (75ppm x 30 hoặc 60 phút điều trị) đối với *Neobenedenia girellae* trong Ví dụ 1; A: ngay sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 30 phút điều trị; B: ngay sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 60 phút điều trị; C: 60 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 60 phút điều trị; D: 10 giờ sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 60 phút điều trị (D-1: cá thể đã bị rời ra; D-2: cá thể vẫn bám).

Fig.5 là tập hợp các đồ thị thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm hoặc 75ppm đối với *Neobenedenia girellae* trong Ví dụ 2.

Fig.6 là tập hợp các ảnh chụp cho thấy *Neobenedenia girellae* bị tác động ở các khu điều trị tương ứng trong Ví dụ 2; A: 30 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 60 phút điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm; B: 30 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 60 phút điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm; C: 30 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 60 phút điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 75ppm.

Fig.7 là đồ thị thể hiện tác động của việc điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm hoặc 75ppm đến cá bị tái nhiễm *Neobenedenia girellae* trong Ví dụ 6.

Fig.8 là tập hợp các đồ thị thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit đối với *Benedenia seriola* trong Ví dụ 7.

Fig.9 là tập hợp các ảnh chụp cho thấy *Benedenia seriola* bị tác động bởi việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit trong Ví dụ 7; các mũi tên biểu thị sự co giác bám và/hoặc cá thể đã bị rời ra; A: Ngay sau điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm trong thời gian 3 phút; B: 2 giờ sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 3 phút điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm; C: Ngay sau điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ 75ppm trong 30 phút; D: 2

giờ sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau 30 phút điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ 75ppm .

Fig.10 là hai ảnh chụp thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm hoặc 75ppm đối với *Zeuxapta japonica* trong Ví dụ 9; sự co giãn bám sau được chỉ ra trên hình vẽ; A: Ngay sau điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm trong thời gian 6 phút; B: sau 10 phút điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ 75ppm .

Fig.11 là tập hợp các đồ thị thể hiện tác động của dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ 300ppm, 75ppm hoặc 50ppm đối với *Zeuxapta japonica* trong Ví dụ 9.

### Mô tả chi tiết sáng chế

[0012] Ký sinh trùng mục tiêu cần điều trị theo sáng chế bao gồm sán lá đơn chủ sống trên cá thuộc lớp Monogenea trong ngành Platyhelminthes (thường được gọi là ký sinh trùng sống trên da cá hoặc ký sinh trùng sống trong mang cá), và rận cá thuộc lớp Crustacea trong ngành Arthropoda. Ký sinh trùng được gọi là ký sinh trùng sống trên da cá bao gồm ký sinh trùng thuộc phân họ Benedeniine và sán lá đơn chủ khác sống ký sinh trên cá biển. Được bao gồm trong phân họ Benedeniine là *Benedenia* như *Benedenia seriola*, *Benedenia epinepheli*, *Benedenia hoshinai*, và *Benedenia sekii*, cũng như *Neobenedenia* như *Neobenedeniagirellae* và *Neobenedeniacongeri*. Sán lá đơn chủ được gọi là ký sinh trùng sống trong mang cá là sán lá đơn chủ thuộc họ Heteraxine (Polypisthocotylea) và ví dụ là *Heteraxine heterocerca* và *Zeuxapta japonica*, hoặc thuộc họ Microcotyle và ví dụ là *Bivagina tai*, *Microcotyle sebastis* và *Microcotyle sebastisci*, cũng như thuộc họ Diclidophoridae và ví dụ là *Heterobothrium okamotoi* và *Neoheterobothrium hirame*. Một số ký sinh trùng được gọi là ký sinh trùng sống trong mang cá được phân loại thuộc bộ Monopisthocotylea và bao gồm *Lamellodiscus* spp. thuộc giống *Lamellodiscus*. Caligus được lấy làm ví dụ là *Caligus longipedis*, *Pseudocaligus fugu* và *Caligus orientalis*, tất cả đều thuộc họ Caligidae. Sáng chế đặc biệt có hiệu quả đối với *Neobenedenia*, *Benedenia*, *Zeuxapta japonica*, *Bivagina tai*, và *Lamellodiscus* spp.

[0013] Trong sáng chế, thuật ngữ “cá biển” được dùng để chỉ các loài cá biển được điều trị như cá nuôi và cá cảnh cần loại bỏ ký sinh trùng. Có tầm quan trọng đặc biệt lớn trong công nghiệp là cá nuôi như *Takifugu rubripes* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae), *Epinephelinae* (Perciformes: Serranidae), và cá rô phi (Perciformes: Cichlidae); các loài cá này đều được biết là có thể bị nhiễm ký sinh trùng cá như ký sinh trùng sống trên da cá và ký sinh trùng sống trong mang cá và có thể được điều trị bằng dung dịch Hoá chất theo sáng chế cho mục đích phòng bệnh hoặc chữa bệnh.

Các loài cá cần được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế bao gồm cá nuôi, cá cảnh và cá cảnh thương phẩm ở độ tuổi bất kỳ sống trong nước biển. Cụ thể, cá nuôi có thể được lấy làm ví dụ là cá thuộc các bộ Perciformes, Pleuronectiformes, Tetraodontiformes, Clupeiformes, và Anguilliformes và kể cả các loài *Seriola*, cá thuộc họ *Serranidae*, *Sparidae*, *Paralichthyidae*, *Tetraodontidae*, *Cá hòiidae*, và *Anguillidae*. Ví dụ cụ thể bao gồm: cá bò biển lớn (*Seriola dumerili*), cá trác Almaco (*Seriola rivoliana*), cá trác sọc vàng (yellowtail) (*Seriola quinqueradiata* (Buri hoặc Hamachi)), cá bò biển sọc vàng (*Seriola lalandi*), cá sòng Nhật (*Trachurus japonica*), cá trác có sọc (*Pseudocaranx dentex*), cá thu Nhật (*Scomber japonicus*), cá mú Nhật (*Lateolabrax japonicus*), cá tráp đỏ (*Pagrus major*), cá vằn đầu nhọn (*Oplegnathus fasciatus*), cá đĩa (*Oplegnathus punctatus*), cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*), cá bóp (*Rachycentron canadum*), cá song chấm đỏ (*Epinephelus akaara*), cá song răng dài (*Epinephelus bruneus*), cá mú bảy sọc (*Epinephelus septemfasciatus*), cá mú đốm cam (*Epinephelus coioides*), cá mú Malabar (*Epinephelus malabaricus*), cá mú lưng gù (*Chromileptes altivelis*), cá mú đỏ (*Plectropomus leopardus*), cá mú không lò (*Epinephelus lanceolatus*), cá Marbled Rockfish (*Sebasticus marmoratus*), cá bơn Nhật (*Paralichthys olivaceus*), cá bơn Barfin (*Verasper moseri*), cá bơn có đốm (*Verasper variegatus*), cá bơn (*Pestta maxima*), cá bơn (*Hippoglossus stenolepis*), cá nóc hồ (*Takifugu rubripes*), cá Thread-sail filefish (*Stephanolepis cirrhifer*), cá Yellow tang (*Zebrasoma flavescens*), cá Scraper đen (*Thamnaconus modestus*), cá hòi vân (*Oncorhynchus mykiss*), cá hòi Đại Tây Dương (*Salmo salar*), cá hòi Coho (*Oncorhynchus kisutch*), cá hòi đỏ (*Oncorhynchus nerka*). Cụ thể, cá bò biển lớn (*Seriola dumerili*), cá Yellow tang (*Seriola quinqueradiata* (Buri)), cá thuộc họ *Serranidae*, cá bóp, cá chỉ vàng (family, Lutjanidae), cá chêm (*Lates*

*calcarifer*), cá rô phi, cá mú Nhật (*Lateolabrax japonicus*), v.v.. đã được báo cáo là nạn nhân thường xuyên của ký sinh trùng sống trên da cá.

[0014] Dung dịch nước hydro peroxit được sử dụng trong sáng chế không phải là các sản phẩm loại đặc biệt mà có thể là các sản phẩm thông thường có bán trên thị trường. Ví dụ, dung dịch 35% có bán trên thị trường có thể được pha loãng đến nồng độ định trước khi sử dụng để dùng làm dung dịch điều trị. Để dùng cho cá biển, thông thường dung dịch nước hydro peroxit cần được sử dụng được giữ trong bể điều trị ở nồng độ ít nhất là 300ppm và thực tế điều này vẫn đang được thực hiện. Tuy nhiên, theo sáng chế, việc điều trị trong bể được tiến hành bằng cách sử dụng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp nằm trong khoảng từ 30 đến 150ppm, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 100ppm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 đến 90ppm, nằm trong khoảng từ 30 đến 80ppm, hoặc nằm trong khoảng từ 37,5 đến 75ppm. Tốt hơn là, việc ngâm trong dung dịch kéo dài trong thời gian 15 phút và lâu hơn. Tùy thuộc vào các loài cá, thời gian ngâm có thể được kéo dài thêm mà không gây ra tác động bất lợi thấy được bất kỳ đến cơ thể của cá nếu nồng độ hydro peroxit được giữ đủ thấp và, do đó, không có giới hạn cụ thể về thời gian ngâm. Như thấy được trong Ví dụ 5 dưới đây, việc điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  150ppm trong thời gian 6 giờ có các triệu chứng như chán ăn nhưng không làm cá chết khi sử dụng dung dịch  $H_2O_2$  300ppm; đã quan sát thấy không có sự bất thường nào khi sử dụng dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ 75ppm. Mặt khác, cơ thể cá không phải chịu áp lực quá mức và vì hiệu quả hoạt động, việc ngâm trong dung dịch nên kéo dài trong thời gian từ 15 đến 120 phút, tốt hơn là trong thời gian từ 15 đến 90 phút, và tốt hơn nữa là trong thời gian từ 30 đến 60 phút. Do đó, tốt hơn là việc ngâm trong dung dịch  $H_2O_2$  được tiến hành ở nồng độ từ 30 đến 150ppm trong thời gian từ 15 phút đến 6 giờ, tốt hơn nữa là trong thời gian từ 15 phút đến 2 giờ; theo cách khác, tốt hơn là được tiến hành ở nồng độ từ 30 đến 100ppm trong thời gian từ 15 phút đến 6 giờ, tốt hơn nữa là trong thời gian từ 15 phút đến 2 giờ.

Ví dụ, đối với các ký sinh trùng monopisthocotylean và polypisthocotylean, trừ *Bivagina tai*; tốt nhất là các ký sinh trùng này được điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  có nồng độ nằm trong khoảng từ 37,5 đến 75ppm, trong khi tốt hơn là *Bivagina tai* được điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  có nồng độ nằm trong khoảng từ 75 đến 100ppm.

Việc điều trị bằng dung dịch nêu trên được tiến hành ngay khi có nghi ngờ cá bị nhiễm ký sinh trùng. Một lần ngâm sẽ là đủ. Nếu có nghi ngờ cá bị nhiễm ký sinh trùng khác trong quá trình nuôi cá sau đó, thì một lần ngâm có thể được thực hiện một cách nhanh chóng.

Như được sử dụng trong sáng chế, ký hiệu “ppm” biểu thị lượng hydro peroxit trong nước tinh theo khối lượng/thể tích.

[0015] So với việc điều trị bằng dung dịch thông thường được thực hiện với dung dịch  $H_2O_2$  nồng độ cao, phương pháp theo sáng chế tiến hành việc điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  với nồng độ thấp hơn có thể loại bỏ được các ký sinh trùng một cách hữu hiệu hơn và cho các kết quả của các ví dụ được mô tả dưới đây, lý do này có thể được giải thích như sau.

Khi *Neobenedenia girellae* được điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit ( $25^\circ C$ ) ở nồng độ khoảng 300ppm trong thời gian 6 phút, cơ thể ký sinh trùng bị co lại nhưng các giác hút (hoặc các giác bám) để bám vào vật chủ không bị co hoặc bị biến dạng. Kết quả là, ký sinh trùng vẫn bám được vào thành trong của đĩa nuôi cấy mô và được phục hồi dần sau khi điều trị (Ví dụ 1). Có thể, điều tương tự đã xảy ra trên bề mặt cơ thể vật chủ, điều này dẫn đến hiệu quả trừ ký sinh trùng không ổn định. Như một vấn đề của thực tế, khi *Seriola dumerili* nhiễm *Neobenedenia girellae* được điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ 300ppm trong thời gian 6 phút, thì mức độ loại bỏ chỉ là 59,1%, điều này chỉ ra rằng việc điều trị này (Ví dụ 3) có hiệu quả trừ ký sinh trùng hạn chế.

Mặt khác, khi *Neobenedenia girellae* được điều trị ở nồng độ thấp 75ppm và 50ppm trong khoảng thời gian từ 30 đến 60 phút, cơ thể ký sinh trùng bị co ở mức độ thấp hơn nhưng các giác hút cũng bị co và biến dạng, nên bị rời ra khỏi thành trong của đĩa nuôi cấy mô. Hơn thế nữa, *Neobenedenia girellae* vẫn bị co ngay cả sau khi điều trị (Ví dụ 1).

Ngay cả khi *Neobenedenia girellae* được điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ cao (300ppm) trong thời gian 60 phút, thì các giác hút (hoặc các giác bám) bị co và bị biến dạng chỉ 30%. Do đó, rõ ràng rằng nồng độ thấp 75ppm và 50ppm là có hiệu quả hơn so với nồng độ cao trong việc làm co hoặc làm biến dạng các giác hút của

*Neobenedenia girellae* (Ví dụ 2).

*Seriola dumerili* nhiễm *Neobenedenia girellae* được điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit (25°C) ở nồng độ khoảng 75ppm trong thời gian 30 phút. Mức độ loại bỏ thu được là 94,3%. Khi việc điều trị được tiến hành bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ 50ppm trong thời gian 30 phút, thì mức độ loại bỏ là 86,6%. Do đó, rõ ràng rằng để loại bỏ *Neobenedenia girellae*, việc làm cho giác bám co hoặc biến dạng là bước quan trọng để đạt được hiệu quả trừ ký sinh trùng không thay đổi (Ví dụ 3). Hơn thế nữa, trong Ví dụ 4 đã khẳng định rằng có thể đạt được hiệu quả trừ ký sinh trùng cao thậm chí trong điều kiện sử dụng dung dịch hydro peroxit có nồng độ 37,5ppm trong 30 phút hoặc 60 phút. Với nồng độ hydro peroxit thấp, giác bám của *Neobenedenia girellae* sẽ co hoặc biến dạng đến khi nó bị rời ra khỏi vật chủ, với kết quả là không cho phép các ký sinh trùng hồi phục sau khi điều trị và hiệu quả trừ ký sinh trùng là không thay đổi được kỳ vọng.

[0016] Ở các điểm nuôi cá, việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit được thực hiện bằng cách trước tiên dùng tấm ngăn để tạo ra khu vực chứa có dung tích khoảng 200 tấn, nạp vào đó dung dịch hydro peroxit ở nồng độ nằm trong khoảng 300ppm, và sau đó thả cá vào khu vực này. Khi *Seriola dumerili* được điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ 150ppm và cao hơn, thấy rằng cá bơi dữ dội lên và xuống trong thời gian từ 1 đến 3 phút sau khi bắt đầu điều trị, có thể là do tác động kích thích (Ví dụ 5). Trong mùa hè, nước có nhiệt độ cao, đôi khi xảy ra hiện tượng cá chết có thể là do thiếu oxy và có thể là do sự bơi dữ dội được quan sát trong thử nghiệm nêu trên. Mặt khác, việc ngâm *Seriola dumerili* trong dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ nằm trong khoảng 75ppm trong thời gian 6 giờ đã không gây ra tác động bất lợi nào đến tập tính bơi và ăn vào ngày hôm sau (Ví dụ 5). Các kết quả này đã cho thấy rằng *Seriola dumerili* hoàn toàn có thể được điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ thấp hơn 150ppm, đặc biệt là ở nồng độ 75ppm và thấp hơn. Cũng dễ dàng thấy rõ rằng việc điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  nồng độ cao đã làm tổn thương bề mặt cơ thể của *Seriola dumerili*, khiến cho chúng dễ bị tái nhiễm *Neobenedenia girellae* trong khi việc điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  với nồng độ thấp không làm tổn thương bề mặt cơ thể của cá (Ví dụ 6).

[0017] Ở Na Uy, các chủ trại cá hồi đang thực hiện việc điều trị bằng dung dịch bằng

cách sử dụng tấm ngăn, trong đó các lồng cá được bao quanh bằng các tấm ngăn ở các phía của chúng. Do phương pháp này không cần phải chuyển cá vào thùng có dung tích bị giới hạn dùng làm bể thuốc để điều trị, nên lượng oxy hoà tan trong môi trường nuôi có thể được đảm bảo. Cũng có thể duy trì lượng oxy hòa tan trong môi trường nước bằng cách cung cấp oxy hoặc không khí. Nếu phương pháp thông thường này được kết hợp với sáng chế, thì việc điều trị bằng dung dịch có thể được thực hiện trong khoảng thời gian tương đối dài từ 30 phút đến 60 phút.

Để làm phương tiện nạp hóa chất, thiết bị chuyên dụng dưới dạng ống dẫn đục lỗ được thiết kế và nó cho phép hoá chất được phun một cách đồng thời ở tất cả các mức, từ bề mặt đến đáy của lồng nuôi cá. Tác dụng này được kết hợp với việc bơi của cá để giúp cho hóa chất khuếch tán và tạo ra sự phân phối đồng đều.

Đặc biệt, các mặt của lưới lồng được bao quanh bằng tấm ngăn để tạo ra khu vực giữ nước biển bên trong; sau đó dung dịch nước hydro peroxit này được nạp vào nước biển trong lồng với lượng sao cho nồng độ trung bình theo tính toán nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm, và sau thời gian ít nhất 15 phút, tốt hơn là từ 15 phút đến 6 giờ hoặc từ 15 phút đến 2 giờ, và tốt hơn nữa là từ 30 đến 60 phút, tấm ngăn này được lấy ra, ngay khi đó việc điều trị bằng dung dịch theo sáng chế được hoàn thành. Bằng cách này, có thể đạt được việc điều trị bằng dung dịch mà không làm cho cá bị stress bất kỳ.

[0018] Các tác giả sáng chế đã khẳng định rằng các kết quả tương tự với các kết quả đối với *Neobenedeniagirellae* có thể thu được đối với *Benedenia seriola* (các ví dụ 7, 11 và 12). Hơn thế, có thể thấy rõ từ thí nghiệm in vivo rằng phương pháp theo sáng chế cũng cho thấy hiệu quả trừ ký sinh trùng *Lamellodiscus* spp. rõ ràng (Ví dụ 8). *Benedenia seriola* được phân loại thuộc giống *Benedenia* (Monogenea: Monopisthocotylea), *Neobenedenia girellae* thuộc giống *Neobenedenia* (Monopisthocotylea), và *Lamellodiscus* spp. thuộc giống *Lamellodiscus* (Monopisthocotylea). Do bể dung dịch nước hydro peroxit với nồng độ thấp có hiệu quả trừ ký sinh trùng cao đối với tất cả các ký sinh trùng này, nên chúng được coi là có hiệu quả trừ monopisthocotylean thuộc lớp Monogenea.

Ngoài ra, sự biến dạng của các ký sinh trùng và thời gian bám của nó trong khi điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ thấp cũng được quan sát ở *Zeuxapta*

*japonica* có các giác bám sau mang nhiều giác hút sau (Ví dụ 9). Một nghiên cứu bằng thử nghiệm *in vivo* đã cho thấy rằng phương pháp theo sáng chế cũng có hiệu quả trừ ký sinh trùng này một cách rõ ràng (Các ví dụ 11 và 12). Hiệu quả trừ ký sinh trùng rõ ràng cũng được thể hiện đối với *Bivagina tai* (Ví dụ 10). *Zeuxapta japonica* được phân loại thuộc giống *Zeuxapta* (Monogenea: Polypisthocotylea) và *Bivagina tai* thuộc giống *Bivagina* (Polypisthocotylea). Do dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp có hiệu quả trừ ký sinh trùng cao đối với cả hai loại ký sinh trùng này, nên chúng cũng được xem là có hiệu quả đối với polypisthocotylean thuộc lớp Monogenea.

Mặc dù các ví dụ dưới đây mô tả các ví dụ thực hiện sáng chế, nhưng cần phải hiểu rằng chúng không dùng để giới hạn phạm vi của sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví dụ 1**

[0019] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Neobenedenia girellae* của việc điều trị *in vitro* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp - 1>

Phương pháp thử nghiệm: Bốn con cá *Seriola quinqueradiata* (buri), mỗi con nặng khoảng 100g được nhốt trong một thùng có dung tích 100-L và được cho tiếp xúc với 2000 ấu trùng *Neobenedenia girellae* mới nở. Vào ngày 14 sau khi tiếp xúc, cá được lấy mẫu và ấu trùng trưởng thành sống ký sinh trên bề mặt cơ thể cá được thu gom bằng các nhíp và được thử nghiệm. Nhiệt độ của nước trong thời gian giữ là  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Nước biển được làm tiệt trùng bằng tia cực tím và được lọc trước khi nó được cấp với tốc độ 1,2 L/phút. Cá được cho ăn thức ăn EP thương phẩm, mỗi ngày một lần với liều lượng 2% thể trọng cá.

Bảy đĩa nuôi cấy mô có đường kính 90mm, mỗi đĩa chứa nước biển (20 ml), được chuẩn bị và 10 cá thể ký sinh trùng trưởng thành được chứa trong mỗi đĩa nuôi cấy mô này và được để cho bám vào đĩa nuôi cấy mô này. Sau khi chúng bám vào các đĩa nuôi cấy mô tương ứng, các ký sinh trùng này được rửa bằng nước biển ba lần. Sau đó, nước biển được loại bỏ, đầu tiên bằng thiết bị gạt và sau đó là bằng giấy lau Kimwipe. Các đĩa nuôi cấy mô tương ứng được bổ sung 7 dung dịch thử nghiệm, mỗi dung dịch với thể tích 20 ml, và các ký sinh trùng được nuôi ở nhiệt độ trong phòng ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Sau



khi điều trị, các đĩa nuôi cấy này được rửa bốn lần bằng nước biển, sau đó 20ml nước biển được bổ sung vào mỗi đĩa, và các ký sinh trùng được nuôi trong thời gian 10 giờ. Số con bị co và số con ký sinh trùng trưởng thành rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô được đếm và được ghi lại vào các thời điểm khác nhau, tức là ngay sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị, trong khoảng thời gian 2 giờ cách nhau 30 phút một sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển, và 10 giờ sau khi điều trị. Ngoài ra, kích thước của *Neobenedeniagirellae* trong thử nghiệm được xác định bằng cách đo chiều dài cơ thể của 30 cá thể ký sinh trùng này.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 1 dưới đây.

[0020] [Bảng 1]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Thời gian ngâm | Ghi chú                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1              | 300ppm                                | 3 phút         | Phương pháp thông thường (liều lượng và cách dùng) để loại bỏ <i>Benedenia seriolae</i> |
| 2              | 300ppm                                | 6 phút         | Điều trị gấp đôi thời gian điều trị đã định                                             |
| 3              | 75ppm                                 | 30 phút        | 1/4 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 4              | 75ppm                                 | 60 phút        | 1/4 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 5              | 50ppm                                 | 30 phút        | 1/6 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 6              | 50ppm                                 | 60 phút        | 1/6 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 7              | 0ppm                                  | 60 phút        | Khu đối chứng không được điều trị                                                       |

#### [0021] Kết quả và thảo luận

Các ký sinh trùng được thử nghiệm có chiều dài cơ thể bằng  $4,17 \pm 0,25$  mm.

Dung dịch hydro peroxit là tác nhân loại bỏ *Benedenia seriolae* sống ký sinh trên bề mặt cơ thể của loài cá *Seriola* và *Bivagina tai* sống ký sinh trong mang cá *Pagrus major*; liều lượng và cách dùng của nó là sao cho hydro peroxit được dùng ở nồng độ khoảng 300ppm trong thời gian 3 phút.

*Neobenedenia girellae* trong Khu thử nghiệm 1, tất cả các cá thể này ngay sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị đều bị co ở mức trung bình (Fig.1 và Fig.2B) và khoảng 10 phút sau khi đưa trở lại vào nước biển, mức độ co này được tăng lên và 3 trong số 10 cá thể bị co ở mức rất mạnh (Fig. 2C). Tuy nhiên, các cá thể bị

co được hồi phục dần (Fig. 2D) và tất cả các cá thể không còn bị co nữa trong 30 phút sau khi chúng được đưa trở lại nước biển (Fig. 1).

*Neobenedenia girellae* trong Khu thử nghiệm 2, tất cả các cá thể này, ngay sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị, đều bị co ở mức rất mạnh (Fig. 3A). Ngay cả khi 30 phút sau khi đưa trở lại nước biển sau khi điều trị, tất cả các cá thể vẫn bị co (Fig. 1) nhưng với sự phục hồi co ở mức độ trung bình (Fig. 3B). Sau 60 phút sau khi đưa trở lại nước biển, 90% cá thể này không còn bị co nữa (Fig. 1 và Fig. 3C).

Trong khu thử nghiệm 1 (thời gian điều trị: 3 phút) và Khu thử nghiệm 2 (thời gian điều trị: 6 phút), giác bám (các giác hút lớn) của *Neobenedenia girellae* không bị co (Fig. 2B và 2C và Fig. 3A). Từ các kết quả này, việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ 300ppm trong thời gian 3 phút, là điều kiện thông thường để loại bỏ *Benedenia*, và việc điều trị hai lần (6 phút) được thấy là có hiệu quả trừ ký sinh trùng vì ký sinh trùng bị bật ra khỏi bề mặt cơ thể cá qua tác dụng vật lý, như cá tiếp xúc với nhau hoặc cọ vào lưới lồng, trong khoảng thời gian tương đối ngắn trước khi ký sinh trùng bị co sẽ hồi phục. Do các cá thể này không chịu tác dụng vật lý bất kỳ được hồi phục, nên việc điều trị này được coi là có hiệu quả trừ ký sinh trùng hạn chế.

Trong các khu thử nghiệm 3 và 5, tất cả các cá thể, ngay sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau 30-phút điều trị, đã bị co ở mức trung bình (Fig.1 và Fig. 4A). Trong cả hai khu điều trị, mức độ co của các ký sinh trùng thường mạnh hơn sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị. Xu hướng này là giống như xu hướng quan sát được trong khu điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  300ppm trong thời gian 3 phút. Hơn một nửa số ký sinh trùng co được hồi phục trong thời gian 30 phút nhưng đã quan sát thấy rằng một cá thể vẫn bị co ngay cả sau thời gian 1,5 giờ kể từ khi nó được đưa trở lại nước biển (Fig. 1). Trong cả hai trường hợp, giác bám bị co mạnh đến nỗi các ký sinh trùng không thể bám vào đĩa nuôi cấy mô.

Trong các khu thử nghiệm 4 và 6, mức co trung bình xảy ra ngay sau khi điều trị và không quan sát thấy có sự khác biệt lớn nào từ các kết quả với các khu thử nghiệm 3 và 5. Xu hướng trong các khu thử nghiệm 4 và 6 là mức độ co gia tăng sau khi ký sinh trùng được chuyển vào nước biển sau khi điều trị. Đặc biệt là trong Khu thử nghiệm 4, số cá thể rời ra khỏi đĩa nuôi cấy mô tăng dần trong khoảng thời gian 60 phút sau khi chúng

được đưa trở lại nước biển và sau 60 phút, mức độ rời ra đạt đến 100%. Trong cả hai lần thử nghiệm 4 và 6, hơn một nửa số cá thể ký sinh trùng bị co ngay cả sau 120 phút sau điều trị. Vị trí co được đánh dấu là ở giác bám (Fig.4B và 4C). Hơn thế nữa, trong Khu thử nghiệm 4, thấy rằng 7 cá thể ký sinh trùng không hồi phục được ngay cả sau 10 giờ và 4 cá thể trong số chúng không bám vào đĩa nuôi cấy mô. Các giác bám không ngừng bị co và không chỉ cá thể không bám vào đĩa nuôi cấy mô mà còn cả các thể bám vào các đĩa cũng bị co (Fig. 4D).

Các kết quả này cho thấy rằng ngay cả khi hydro peroxit ở các nồng độ thấp bằng 75ppm và 50ppm, thì *Neobenedeniagirellae* có thể được loại bỏ bằng cách điều trị trong thời gian 30-60 phút. Do giác bám của *Neobenedeniagirellae* bị co rất mạnh, nên việc điều trị này được coi là có hiệu quả trừ ký sinh trùng cao ổn định khi so với việc điều trị ở nồng độ cao trong thời gian ngắn thường được thực hiện trong các lồng nuôi cá.

Trong Khu thử nghiệm 7, không quan sát thấy có sự co của *Neobenedeniagirellae* hoặc sự rời ra khỏi đĩa nuôi cấy mô trong khoảng thời gian thử nghiệm này.

## Ví dụ 2

[0022] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Neobenedeniagirellae* của việc điều trị *in vitro* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp - 2>

Phương pháp thử nghiệm: Thử nghiệm được thực hiện như trong Ví dụ 1. *Neobenedeniagirellae* sống ký sinh trên *Seriola quinqueradiata* (buri) vào ngày 12 sau khi cho tiếp xúc với ký sinh trùng được thử nghiệm, trong đó 10 cá thể trưởng thành được chứa trong đó và cho phép bám vào mỗi trong số ba đĩa nuôi cấy mô. Số cá thể co và các ký sinh trùng trưởng thành rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô được đếm và được ghi lại vào các thời điểm khác nhau, tức là sau 30 phút điều trị, sau 60 phút điều trị và các ký sinh trùng này được đưa trở lại nước biển, và sau 30 phút sau khi đưa trở lại nước biển.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 2 dưới đây.

[0023]

[Bảng 2]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Thời gian ngâm | Ghi chú                                                     |
|----------------|---------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------|
| 1              | 300ppm                                | 60 phút        | Liều lượng thông thường để loại bỏ <i>Benedenia seriola</i> |
| 2              | 75ppm                                 | 60 phút        | 1/4 nồng độ ở liều lượng thông thường                       |
| 3              | 0ppm                                  | 60 phút        | Khu đối chứng không được điều trị                           |

## [0024] Kết quả và thảo luận

Các ký sinh trùng được thử nghiệm có chiều dài cơ thể  $3,86 \pm 0,29$  mm.

*Neobenedenia girellae* trong Khu thử nghiệm 1 bị co trong thời gian từ 2 đến 3 phút sau khi bắt đầu điều trị và 6 phút sau, sự co trở nên rõ ràng. Tuy nhiên, trong các quan sát ở ba thời điểm khác nhau, tức là sau 30 phút điều trị, ngay sau 60 phút điều trị, và 30 phút sau khi kết thúc điều trị và các ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển, tất cả các cá thể *Neobenedenia girellae* bị co nhưng chỉ thấy có ba cá thể rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô (Fig. 5). 30 phút sau khi kết thúc điều trị và các ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển, tất cả các cá thể đều bị ảnh hưởng rất nhiều khiến cho cơ thể của chúng chuyển sang đục và chúng không thể di chuyển được và, không quan sát thấy có sự co hoặc sự biến dạng ở các giác bám của 7 cá thể, bám vào đĩa nuôi cấy mô (Fig. 5 và Figs. 6A và 6B). Hai trong số cá thể này rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô chỉ sau vài giờ sau điều trị. Trong hai cá thể này, sự co chuyển sang mức trung bình và cơ thể của chúng bị chuyển sang đục một cách rõ ràng; do đó có thể kết luận rằng chúng đã chết.

Số cá thể rời ra khỏi đĩa nuôi cấy mô trong Khu thử nghiệm 2 là 9 ở mỗi hai thời điểm, tức là ngay sau 60 phút điều trị và trong 30 phút sau khi kết thúc điều trị và các ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển (Fig. 5). Các ký sinh trùng bị rời ra không chỉ cơ thể của chúng bị co mà còn các giác bám của chúng cũng bị co hoặc bị biến dạng (Fig. 6C), giống như các kết quả thử nghiệm của Ví dụ 1.

Các kết quả này đã cho thấy rằng so với nồng độ cao ở liều lượng thông thường, các nồng độ thấp hơn là 75ppm và 50ppm rõ ràng là có hiệu quả hơn trong việc làm cho giác hút của *Neobenedenia girellae* bị co hoặc bị biến dạng. Với các kết quả này, đã cho rằng việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ thấp bằng 75ppm hoặc 50ppm không chỉ có tác dụng vật lý của liều lượng thông thường để đánh bật *Neobenedenia*

*girellae* bị co ra khỏi bề mặt cơ thể của cá khi chúng tiếp xúc với nhau hoặc cọ vào lưới lồng hoặc các vật cản khác mà còn có tác dụng làm cho *Neobenedenia girellae* rời ra khỏi bề mặt cơ thể vật chủ bằng cách gây ra sự co hoặc sự biến dạng của giác bám mà nhờ đó *Neobenedenia girellae* bám vào vật chủ, và vì các tác dụng này kết hợp với nhau, nên việc điều trị bằng phương pháp theo sáng chế luôn có được hiệu quả trừ ký sinh trùng cao hơn so với việc điều trị ở nồng độ cao trong thời gian ngắn thường được thực hiện trong các lồng nuôi cá.

Trong Khu thử nghiệm 3, không quan sát thấy có sự co của *Neobenedenia girellae* hoặc sự rời ra khỏi đĩa nuôi cấy mô trong khoảng thời gian thử nghiệm này.

### Ví dụ 3

[0025] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Neobenedenia girellae* của việc điều trị *in vivo* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp - 1>

Phương pháp thử nghiệm: 48 con cá *Seriola dumerili* trung bình mỗi con nặng khoảng 130g được giữ trong thùng dung tích 500-L trong thời gian khoảng 7 ngày đến khi chúng thích nghi với nhiệt độ của nước 25°C. Trong quá trình thích nghi, cá được cung cấp thức ăn chăn nuôi, với mức độ cấp thức ăn được điều chỉnh đến 2% thể trọng cá. Nước biển được bơm với tốc độ 8,3 L/phút. Sau khi thích nghi, khoảng 4500 cá thể ấu trùng mới nở của *Neobenedenia girellae* được đưa vào thùng dung tích 500-L và việc cung cấp nước biển được tạm dừng trong một giờ để cho cá được cho tiếp xúc với ký sinh trùng. Vào ngày thứ 7 sau khi cho tiếp xúc với ấu trùng mới nở, cá được chuyển tới 7 thùng dung tích 200-L để thiết lập các khu thử nghiệm (Bảng 3). Bốn con cá còn lại, dành cho việc đo độ dài cơ thể của *Neobenedenia girellae* trong khi điều trị bằng dung dịch hydro peroxit, liên tục được giữ trong thùng dung tích 500-L và ở các lần thay đổi việc điều trị bằng dung dịch, các ký sinh trùng được thu gom và 30 cá thể được đo chiều dài cơ thể của chúng. Trong thời gian giữ, nước biển được bơm với tốc độ 6,7 L/phút. Sau 9 ngày tiếp xúc, mỗi khu thử nghiệm được thực hiện việc điều trị bằng dung dịch trong thùng đáy vuông dung tích 200-L và sau khi điều trị, cá được đưa trở lại các thùng dung tích 200-L, trong đó chúng được giữ đến ngày tiếp theo. Tất cả cá được lấy mẫu để đo thể trọng của chúng và đếm số cá thể ký sinh *Neobenedenia girellae*. Hiệu quả trừ ký sinh

trùng được đánh giá bằng so sánh số cá thể ký sinh *Neobenedeniagirellae* trong các khu thử nghiệm tương ứng.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 3 dưới đây.

[0026] Kết quả và thảo luận

Độ dài cơ thể của *Neobenedeniagirellae* khi điều trị bằng dung dịch Hóa chất là  $3,01 \pm 0,43$  mm, chỉ ra rằng chúng đã trưởng thành.

Hiệu quả trừ ký sinh trùng trên *Neobenedeniagirellae* sống ký sinh *Seriola dumerili* được thể hiện trong Bảng 3.

Khu thử nghiệm 1 (sử dụng liều lượng thông thường và dùng dung dịch hydro peroxit để loại bỏ *Benedenia seriola*) đã cho thấy mức độ loại bỏ *Neobenedeniagirellae* là 33,5%. Khu thử nghiệm 2, trong đó thời gian ngâm được tăng gấp đôi lên 6 phút có mức độ loại bỏ là 59,1%. Trong số phát hiện từ các kết quả thử nghiệm của Ví dụ 1 là việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ 300ppm trong thời gian 6 phút đã làm cho cơ thể của *Neobenedeniagirellae* bị co mạnh nhưng không làm co hoặc biến dạng giác bám của chúng (giác hút lớn) và *Neobenedeniagirellae* bị co hoặc cả hai đều bị co và bị rời ra được hồi phục trong khoảng thời gian một giờ. Các kết quả thử nghiệm của Ví dụ 3 đã cho thấy rõ cơ chế mà nhờ đó việc điều trị trong các điều kiện nêu trên có hiệu quả trừ ký sinh trùng là nhờ các tác dụng vật lý, như cá tiếp xúc với nhau hoặc cọ vào lưới lồng, trong khoảng thời gian tương đối ngắn trước khi ký sinh trùng đang bị co sẽ hồi phục, và đơn giản làm cho cơ thể của ký sinh trùng bị co có hiệu quả trừ ký sinh trùng bị giới hạn.

Các khu thử nghiệm 3 và 4 đã cho thấy mức độ loại bỏ cao hơn lần lượt là 94,3% và 99,2%. Các khu thử nghiệm 5 và 6 đã cho thấy cao mức độ loại bỏ có thể so sánh lần lượt ở 86,6% và 97,5%. Trong các ví dụ 1 và 2, việc điều trị bằng nồng độ hydro peroxit thấp đã làm cho *Neobenedeniagirellae* bị co không chỉ ở cơ thể mà còn ở giác bám. Các kết quả thử nghiệm của các ví dụ 1 và 2 cũng như các kết quả thử nghiệm của Ví dụ 3 đã cho thấy rõ rằng để loại bỏ *Neobenedeniagirellae*, việc làm cho giác bám bị co hoặc bị biến dạng là bước quan trọng để nhờ đó thu được hiệu quả trừ ký sinh trùng cao không đổi.

[0027] [Bảng 3]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Thời gian ngâm <sup>a</sup> | Số cá được thử nghiệm<br>Thể trọng cá khi kết thúc điều trị | Số ký sinh trùng trưởng thành trên mỗi con cá <sup>a,b</sup> | Mức độ loại bỏ |
|----------------|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| 1              | 300ppm                                | 3 phút                      | 6 con cá<br>148,7±17,9 g                                    | 66,2±21,7*                                                   | 33,50%         |
| 2              | 300ppm                                | 6 phút                      | 6 con cá<br>146,5±30,1 g                                    | 40,7±7,5*                                                    | 59,10%         |
| 3              | 75ppm                                 | 30 phút                     | 6 con cá<br>162,2±26,6 g                                    | 5,7±3,2*                                                     | 94,30%         |
| 4              | 75ppm                                 | 60 phút                     | 6 con cá<br>148,9±16,8 g                                    | 0,8±0,8*                                                     | 99,20%         |
| 5              | 50ppm                                 | 30 phút                     | 6 con cá<br>161,6±29,3 g                                    | 13,3±10,8*                                                   | 86,60%         |
| 6              | 50ppm                                 | 60 phút                     | 6 con cá<br>142,8±23,0 g                                    | 2,5±2,4*                                                     | 97,50%         |
| 7              | khu đối chứng không được điều trị     | —                           | 8 cá<br>129,2±14,4 g                                        | 99,5±12,1                                                    | —              |

a: Số lượng ký sinh trùng được biểu thị bằng giá trị trung bình ± SD.

b: Có sự khác biệt đáng kể so với số lượng ký sinh trùng ở khu đối chứng (\* $P < 0,01$ ).

#### Ví dụ 4

[0028] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Neobenedeniagirellae* của việc điều trị *in vivo* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp - 2>

Phương pháp thử nghiệm: Các thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ của nước 30°C bằng phương pháp giống như trong Ví dụ 3. Bốn hai con cá *Seriola dumerili*, mỗi con nặng trung bình khoảng 130g được giữ trong thùng dung tích 500-L trong thời gian khoảng 7 ngày đến khi chúng thích nghi với nhiệt độ của nước 30°C. Cá này được cho tiếp xúc với khoảng 5500 cá thể ấu trùng *Neobenedeniagirellae* mới nở. Ba ngày sau khi tiếp xúc với ấu trùng mới nở này, cá được chuyển vào 6 thùng dung tích 200-L để thiết lập các khu thử nghiệm (Bảng 4). Sau 7 ngày tiếp xúc, mỗi khu thử nghiệm được thực hiện việc điều trị bằng dung dịch, và sau 8 ngày tiếp xúc, hiệu quả trừ ký sinh trùng được đánh giá.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 4 dưới đây.

[0029] Kết quả và thảo luận

Độ dài cơ thể của *Neobenedenia girellae* khi điều trị bằng dung dịch Hóa chất là  $3,01 \pm 0,18$  mm, chỉ ra rằng chúng đã trưởng thành.

Hiệu quả trừ ký sinh trùng đối với *Neobenedenia girellae* sống ký sinh trên cá *Seriola dumerili* được thể hiện trong Bảng 4. Các kết quả của Ví dụ 3 được tái lập. Kết quả này còn cho thấy rằng thậm chí ở nồng độ thấp bằng 37,5ppm, việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit trong khoảng thời gian từ 30 đến 60 phút đã cho thấy hiệu quả trừ ký sinh trùng cao.

[0030] [Bảng 4]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Thời gian ngâm <sup>a</sup> | Số cá được thử nghiệm<br>Thể trọng cá khi kết thúc điều trị | Số ký sinh trùng trưởng thành trên mỗi con cá <sup>a,b</sup> | Mức độ loại bỏ |
|----------------|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| 1              | 300ppm                                | 3 phút                      | 6 con cá<br>163,7 $\pm$ 28,3 g                              | 58,2 $\pm$ 11,2*                                             | 55,50%         |
| 2              | 75ppm                                 | 30 phút                     | 6 con cá<br>161,0 $\pm$ 35,4 g                              | 0,2 $\pm$ 0,4*                                               | 99,90%         |
| 3              | 50ppm                                 | 30 phút                     | 6 con cá<br>142,6 $\pm$ 20,7 g                              | 2,0 $\pm$ 1,8*                                               | 98,50%         |
| 4              | 37,5ppm                               | 30 phút                     | 6 con cá<br>150,0 $\pm$ 21,9 g                              | 10,7 $\pm$ 3,8*                                              | 91,80%         |
| 5              | 37,5ppm                               | 60 phút                     | 6 con cá<br>148,9 $\pm$ 9,0 g                               | 0,0 $\pm$ 0,0*                                               | 100%           |
| 6              | Khu đối chứng không được điều trị     | —                           | 8 con cá<br>150,5 $\pm$ 20,9 g                              | 130,8 $\pm$ 35,0                                             | —              |

a: Số lượng ký sinh trùng được biểu thị bằng giá trị trung bình  $\pm$  SD.

b: Có sự khác biệt đáng kể so với số lượng ký sinh trùng trong khu đối chứng (\* $P < 0,01$ ).

#### Ví dụ 5

[0031] <Hiệu quả của dung dịch nước hydro peroxit đối với *Seriola dumerili* - 1>

Phương pháp thử nghiệm: *Seriola dumerili*, mỗi con nặng trung bình khoảng 208g được chứa trong 6 thùng dung tích 200-L, với mật độ 6 con trong mỗi thùng. Cá được giữ trong thời gian 7 ngày ở nhiệt độ 25°C đến khi chúng thích nghi. Trong quá trình thích nghi, cá được cung cấp thức ăn chăn nuôi, với mức độ cấp thức ăn được điều chỉnh ở mức 2% thể trọng cá. Nước biển được bơm với tốc độ 6,7 L/phút.



Lượng dung dịch nước hydro peroxit quy định, như được pha loãng sơ bộ bằng nước biển, được nạp vào các thùng tương ứng, với việc cấp nước biển được tạm dừng. Sau đó, cá được quan sát trong 6 giờ. Sau 6 giờ điều trị, nước biển lại được bơm vào để tạo ra nước sinh hoạt cho cá.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 5 dưới đây.

[0032] [Bảng 5]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>          | Thời gian ngâm <sup>a</sup> | Số cá được thử nghiệm |
|----------------|------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1              | 900ppm<br>(3 lần liều lượng thông thường)      | 6 giờ                       | 6 con cá              |
| 2              | 600ppm<br>(hai lần liều lượng thông thường)    | 6 giờ                       | 6 con cá              |
| 3              | 450ppm<br>(1,5 lần liều lượng thông thường)    | 6 giờ                       | 6 con cá              |
| 4              | 300ppm<br>(liều lượng thông thường)            | 6 giờ                       | 6 con cá              |
| 5              | 150ppm<br>(nửa liều lượng thông thường)        | 6 giờ                       | 6 con cá              |
| 6              | 75ppm<br>(một phần tư liều lượng thông thường) | 6 giờ                       | 6 con cá              |

[0033] Kết quả và thảo luận

Các kết quả quan sát được thể hiện trong Bảng 6. Trong các khu điều trị bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ 300ppm và cao hơn, cá bơi dữ dội lên và xuống 1-3 phút sau khi bắt đầu việc ngâm trong dung dịch. Việc bơi bất thường này ngớt đi sau đó nhưng khoảng 15 phút sau khi bắt đầu việc ngâm trong dung dịch, đã thấy rằng miệng cá mở nhiều lần hoặc nắp mang cá mở và đóng không kín. Cá này lặp đi lặp lại một loạt động tác bơi, lộn điên cuồng và bơi chậm trước khi chúng chết với các đốm nhỏ xuất hiện trên bề mặt cơ thể. Ngay cả hai con cá còn sống sót trong khu điều trị ở nồng độ 300ppm ăn chậm. Trong khu điều trị ở nồng độ 150 ppm, không phát hiện thấy có cá chết nhưng việc bơi là không bình thường và chúng mở miệng trong quá trình điều trị, và vào ngày sau điều trị, phát hiện thấy hành vi ăn uống không bình thường. Do đó, điều này đã cho thấy rằng nồng độ 300ppm, liều lượng thông thường để loại bỏ *Benedenia seriolae* trên cá thuộc bộ Perciformes, gây độc cho cá trong khoảng thời gian ngắn. Mặt

khác, trong khu điều trị bằng 75ppm, ở mức một phần tư liều lượng thông thường, không quan sát thấy có sự bất thường nào trong khi ngâm trong dung dịch và thậm chí ở thời điểm cho cá ăn sau khi kết thúc việc ngâm trong dung dịch và vào ngày hôm sau, không phát hiện thấy có sự bất thường nào. Do đó, điều này đã cho thấy rằng cá có thể được điều trị một cách tích cực bằng việc điều trị bằng dung dịch trong thời gian kéo dài bằng dung dịch nước hydro peroxit mà không phải chịu tác động bất lợi bất kỳ khi nồng độ của nó thấp hơn 150ppm, đặc biệt là ở nồng độ 75ppm và thấp hơn. Hơn thế nữa, việc điều trị ở nồng độ thấp như nồng độ nêu trên và 50ppm là điều kiện để làm cho giác bám của *Neobenedenia girellae* bị co hoặc bị biến dạng, nhờ đó đảm bảo rằng hiệu quả trừ ký sinh trùng sẽ luôn cao.

Ở các điểm nuôi cá, việc điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit dẫn đến một số cá chết ở nhiệt độ nước cao trong mùa hè, có thể là vì oxy không đủ. Nói chung, đã biết rằng nhiệt độ của nước càng cao, thì mức độ tổn hại gây ra cho mang cá bởi việc điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit càng cao. Trong các thử nghiệm được tiến hành trong Ví dụ 5, hành vi bơi dử dôi được quan sát trong 1-3 phút sau khi bắt đầu điều trị trong các khu sử dụng nồng độ hydro peroxit có nồng độ bằng 150ppm hoặc cao hơn. Do đó, nguyên nhân tử vong có thể bao gồm không chỉ là tác động của hydro peroxit lên mang cá mà còn sự bơi lội mạnh nêu trên đường như là một yếu tố khác gây ra sự thiếu oxy.

[0034] [Bảng 6]

| Khu thử nghiệm | Thời gian từ lúc bắt đầu điều trị đến khi quan sát thấy cá bơi bất thường | Số cá chết | Thời gian từ lúc bắt đầu điều trị đến khi cá chết và mô tả các tác dụng phụ xảy ra vào ngày hôm sau     |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1              | 2 phút, bơi dử dôi lên và xuống                                           | 6 con cá   | tất cả cá chết trong 34-35 phút                                                                         |
| 2              | 1 phút, bơi dử dôi lên và xuống                                           | 6 con cá   | tất cả cá chết trong 27-50 phút                                                                         |
| 3              | 3 phút, bơi dử dôi lên và xuống                                           | 6 con cá   | tất cả cá chết trong 55-129 phút                                                                        |
| 4              | 3 phút, bơi dử dôi lên và xuống                                           | 4 con cá   | 4 cá chết trong 100-300 phút, cá sống sót có hành vi ăn uống chậm vào ngày hôm sau                      |
| 5              | 3 phút, chỉ một con cá bơi dử dôi lên và xuống                            | 0 con cá   | vào ngày hôm sau, 1 con cá có bề mặt cơ thể bị đỏ, 2 con cá ăn kém, và 1 con cá có hành vi ăn uống chậm |
| 6              | không quan sát thấy việc bơi bất thường, v.v.. trong 6-giờ điều trị       | 0 con cá   | không quan sát thấy sự bất thường nào như ăn kém và ăn chậm vào ngày hôm sau                            |

## Ví dụ 6

[0035] <Hiệu quả của dung dịch nước hydro peroxit đối với *Seriola dumerili* - 2>

Phương pháp thử nghiệm: Ba mươi ba con cá *Seriola dumerili*, mỗi con nặng trung bình khoảng 195g được đánh dấu điện tử để nhận biết và được giữ trong thùng dung tích 500-L trong thời gian 7 ngày đến khi chúng thích nghi. Giữ các điều kiện như nguồn nước cấp, mức độ cấp thức ăn và nhiệt độ của nước là như trong Ví dụ 3. Sau khi thích nghi, cá được chuyển vào ba thùng dung tích 200-L, 11 con cá mỗi thùng, và số thẻ đánh dấu trên cá trong mỗi thùng được ghi lại. Ba khu thử nghiệm được thiết lập, một khu được điều trị bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ nằm trong khoảng 300ppm trong thời gian 3 phút, một khu khác được điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ 75ppm trong 30 phút, và khu cuối cùng là khu đối chứng không được điều trị. Sau khi việc điều trị được thực hiện, tất cả cá lại được chứa trong một thùng dung tích 500-L, trong đó có khoảng 7200 cá thể ấu trùng mới nở của *Neobenedenia girella*, và việc cấp nước được tạm dừng trong thời gian 1 giờ. Sau 6 ngày tiếp xúc với ấu trùng, tất cả cá được lấy mẫu và quần thể *Neobenedenia girella* ký sinh được đếm. Mức độ an toàn sau điều trị được đánh giá bằng cách so sánh số quần thể ký sinh *Neobenedenia girellae* trong các khu thử nghiệm tương ứng.

## [0036] Kết quả và thảo luận

Các kết quả quan sát được thể hiện trên Fig.7. Quần thể ký sinh trùng trong khu 300ppm  $H_2O_2$  x 3 phút là lớn hơn một cách đáng kể so với quần thể ký sinh trùng trong khu đối chứng không được điều trị. Trái lại, quần thể ký sinh trùng trong khu 75ppm  $H_2O_2$  x 30 phút là có thể so sánh với ở khu đối chứng. Các kết quả này cho thấy rằng việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit ở nồng độ cao như liều lượng thông thường, thậm chí chỉ kéo dài vài phút, đã gây ra sự tổn hại nhất định cho bề mặt cơ thể của cá, như làm mất đi dịch nhầy, do vậy tạo ra cơ hội tái nhiễm ký sinh trùng lớn hơn. Mặt khác, việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ thấp hơn trong thời gian lâu hơn lại không làm tổn hại bề mặt cơ thể của cá khi cơ hội tái nhiễm ký sinh trùng tăng. Do đó, rõ ràng là phương pháp theo sáng chế có độ an toàn cao hơn cho cá so với phương pháp thông thường không chỉ trong khi điều trị mà còn sau khi điều trị.

## Ví dụ 7

[0037] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Benedenia seriolae* của việc điều trị *in vitro* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp>

Phương pháp thử nghiệm: Bốn con cá *Seriola quinqueradiata* (buri) mỗi con nặng khoảng 150g được chứa trong thùng có dung tích 100-L và được cho tiếp xúc với 1300 cá thể ấu trùng mới nở của *Benedenia seriolae*. Vào ngày 19 sau khi tiếp xúc, cá được lấy mẫu và ký sinh trùng trưởng thành trên bề mặt cơ thể của chúng được thu gom bằng nhíp và được thử nghiệm. Trong khi cá được giữ trong thùng, nước được giữ ở  $20,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . *Seriola quinqueradiata* (buri) được giữ và việc thử nghiệm *in vitro* được thực hiện bằng phương pháp giống như trong Ví dụ 1. Số cá thể co và các con trưởng thành bị rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô được đếm và được ghi lại vào các thời điểm khác nhau, tức là ngay sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị và trong khoảng thời gian 2 giờ, mỗi lần cách nhau 30 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 7 dưới đây.

[0038] [Bảng 7]

| Khu thử nghiệm | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nồng độ | Thời gian ngâm | Ghi chú                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1              | 300ppm                                | 3 phút         | Phương pháp thông thường (liều lượng và cách dùng) để loại bỏ <i>Benedenia seriolae</i> |
| 2              | 300ppm                                | 6 phút         | Điều trị gấp đôi thời gian đã định                                                      |
| 3              | 75ppm                                 | 30 phút        | 1/4 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 4              | 75ppm                                 | 60 phút        | 1/4 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 5              | 0ppm                                  | 60 phút        | Khu đối chứng không được điều trị                                                       |

[0039] Kết quả và thảo luận

Các ký sinh trùng được thử nghiệm có chiều dài cơ thể  $5,30 \pm 0,31$  mm.

Tất cả các cá thể *Benedenia seriolae* trong Khu thử nghiệm 1 bị co ở mức rất mạnh ngay sau khi điều trị (Fig. 9A) và ba trong số mười cá thể bị rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô (Fig. 8). 30 phút sau, do các ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị, bốn cá thể nữa bị rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô. Các giác bám của cá thể đã bị rời ra bị co hoặc bị biến dạng (Fig. 9B). Tuy nhiên, ba cá thể không còn bị co nữa

trong 90 phút sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị. Trong thử nghiệm được thực hiện với *Neobenedeniagirella* trong Ví dụ 1, không phát hiện thấy ký sinh trùng bị rời ra trong các điều kiện đã nêu và tất cả các cá thể không còn bị co nữa trong 30 phút sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị. Các kết quả này cho thấy rằng *Benedenia seriolae* dễ bị tác động bởi dung dịch nước hydro peroxit hơn so với *Neobenedenia girella*.

Trong khu thử nghiệm 2, năm cá thể được thấy là bị rời ra ngay sau khi điều trị và 4 cá thể nữa bị rời ra trong 90 phút sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị. Trong khu thử nghiệm này, một cá thể không còn bị co nữa. Do cả hai khu thử nghiệm đều chứa một số cá thể được thấy là hồi phục không bị co nữa, nên điều này đã cho thấy rằng hiệu quả trừ ký sinh trùng của chúng là bị hạn chế và không ổn định.

Trong khu thử nghiệm 3, tất cả các cá thể bị co và rời ra khỏi thành đĩa nuôi cấy mô trong 13 phút sau khi bắt đầu điều trị. Cũng trong khu thử nghiệm 4, mười trong số mười cá thể bị co, có 9 cá thể bị rời ra trong 13 phút sau khi bắt đầu điều trị, và số còn lại cũng bị rời ra trong vòng 30 phút. Trong cả hai khu thử nghiệm, không có cá thể nào trong số mười cá thể rời ra được thấy là hồi phục không còn bị co nữa hoặc trạng thái rời ra trong khoảng thời gian 2-giờ sau khi chúng được đưa trở lại nước biển sau khi điều trị. Hơn thế nữa, các giác bám của cá thể rời ra bị co hoặc bị biến dạng (Fig.9C và 9D).

Trong khu thử nghiệm 4, các ký sinh trùng, bắt đầu từ khoảng 30 phút sau khi chúng được đưa trở lại vào nước biển sau khi điều trị, cơ thể của chúng chuyển sang đục và ngừng chuyển động, có thể là đã chết.

Vì các phát hiện này, việc điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  có nồng độ 75ppm trong 30 phút, là có lợi vì làm cho giác bám của *Benedenia seriolae* bị co hoặc bị biến dạng và không cho phép chúng hồi phục ngay cả sau 2 giờ sau điều trị, được thấy là có hiệu quả trừ ký sinh trùng ổn định hơn so với việc điều trị 300ppm x 3 phút và 300ppm x 6 phút.

Trong khu đối chứng không được điều trị, không quan sát thấy sự co của *Benedenia seriolae* hoặc sự rời ra khỏi đĩa nuôi cấy mô trong khoảng thời gian thử nghiệm này.

## Ví dụ 8

[0040] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Lamellodiscus* spp. của việc điều trị *in vivo* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp>

Phương pháp thử nghiệm: Năm mươi *Pagrus major* được nuôi cấy trong lồng ngoài trời được thử nghiệm. Nhóm cá này mỗi con có thể trọng trung bình khoảng 74g. *Pagrus major* được chuyển từ lồng này vào thùng loại 1 tấn trên đất liền, từ đó chúng được đưa vào năm thùng loại 30-L, mỗi thùng chứa 15 L nước biển, sao cho mỗi thùng chứa 10 con cá. Để ngăn ngừa sự thiếu oxy, các thùng được sục khí bằng các bơm không khí nhỏ. Đối với các khu thử nghiệm tương ứng, lượng dung dịch hydro peroxit quy định được hòa tan trong 50 mL nước biển và được nạp vào thùng chứa cá, tiếp đó là khuấy trước khi cá được điều trị bằng cách ngâm trong khoảng thời gian cụ thể. Sau khi điều trị, mỗi thùng được làm nghiêng để thu gom cá vào túi lưới và khoảng 3L nước biển được đổ lên cá để rửa chúng. Sau đó, cá được đưa trở lại các thùng, mỗi thùng chứa 18L nước biển, trong đó chúng được giữ trong thời gian hàng giờ có sục khí. Sau đó, cá được lấy mẫu để đếm quần thể *Lamellodiscus* spp. sống ký sinh trong mang cá của chúng. Hiệu quả trừ ký sinh trùng được đánh giá bằng cách so sánh số quần thể ký sinh *Lamellodiscus* spp. trong các khu thử nghiệm tương ứng. Nước biển được sử dụng trong thử nghiệm này có nhiệt độ 22,0°C.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 8 dưới đây.

## [0041] Kết quả và thảo luận

Mức độ loại bỏ *Lamellodiscus* spp. trong khu điều trị 300ppm x 3 phút là 0%. Không có hiệu quả trừ ký sinh trùng với liều lượng thông thường và việc dùng liều lượng hàng ngày để loại bỏ *Bivagina tai*. Thậm chí trong khu điều trị 300ppm x 15 phút, quần thể ký sinh trùng này có thể so sánh với quần thể trong khu đối chứng và cho thấy không có hiệu quả trừ ký sinh trùng. *Pagrus major* trong khu 300ppm x 15 phút, bị ảnh hưởng bởi việc điều trị, đưa trở lại phía của chúng ngay trước khi kết thúc điều trị và việc điều trị tiếp tục được coi là không thể thực hiện được. Mặt khác, trong các khu điều trị 75ppm x 30 phút và điều trị 100ppm x 30 phút, hiệu quả trừ ký sinh trùng là rõ ràng (Bảng 8) và không phát hiện thấy có sự bất thường nào về hành vi của cá, kể cả việc bơi.

Các kết quả này cho thấy rằng việc điều trị bằng dung dịch  $H_2O_2$  ở nồng độ thấp trong khoảng thời gian dài đã tác động đến thùy bám của *Lamellodiscus* spp. mạnh hơn nhiều so với nồng độ cao, khoảng thời gian điều trị ngắn mà chúng bị bật ra. Đã xác nhận rằng việc điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp trong thời gian khoảng thời gian dài cũng có hiệu quả đối với ký sinh trùng này.

*Benedenia seriola*, *Neobenedeniagirella* và *Lamellodiscus* spp. được phân loại là monopisthocotylean thuộc lớp Monogenea. Do việc điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp có hiệu quả trừ ký sinh trùng cao đối với các ký sinh trùng này, chúng được coi là có hiệu quả đối với các ký sinh trùng thuộc bộ Monopisthocotylea của lớp Monogenea.

[0042] [Bảng 8]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ $H_2O_2$ | Thời gian ngâm | Số cá được thử nghiệm<br>Thể trọng cá | Số ký sinh trùng trên mỗi con cá <sup>a</sup> | Mức độ loại bỏ |
|----------------|------------------|----------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------|
| 1              | 300ppm           | 3 phút         | 10<br>60,0±6,5 g                      | 29,1±15,6                                     | 0%             |
| 2              | 300ppm           | 15 phút        | 10<br>64,6±8,7 g                      | 21,1±6,7                                      | 12%            |
| 3              | 100ppm           | 30 phút        | 10<br>61,3±9,8 g                      | 8,0±7,0                                       | 67%            |
| 4              | 75ppm            | 30 phút        | 10<br>64,8±8,3 g                      | 8,8±9,1                                       | 64%            |
| 5              | 0ppm             | —              | 10<br>61,2±7,3 g                      | 24,1±25,8                                     | —              |

a: Số ký sinh trùng được biểu thị bằng giá trị trung bình ± SD.

Ví dụ 9

[0043] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Zeuxapta japonica* của việc điều trị *in vitro* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp>

Phương pháp thử nghiệm: Mang cá được lấy ra khỏi năm con cá *Seriola dumerili* nuôi, mỗi con nặng khoảng 1,4 kg và *Zeuxapta japonica* ký sinh các thớ thịt trong mang cá được thu gom. Thử nghiệm *in vitro* này được thực hiện trên năm cá thể ký sinh trùng trong thời gian mỗi khu điều trị bằng phương pháp giống như trong Ví dụ 1. Tiến hành quan sát ở ba thời điểm, tức là ở giữa quy trình điều trị, ngay sau khi ký sinh trùng được

đưa trở lại nước biển sau khi điều trị, và trong khoảng thời gian 30 phút mỗi lần cách nhau 10 phút sau khi ký sinh trùng được đưa trở lại nước biển; số cá thể co trong các khu tương ứng được đếm và được ghi lại.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 9 dưới đây.

[0044] [Bảng 9]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Thời gian ngâm | Ghi chú                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1              | 300ppm                                | 3 phút         | Phương pháp thông thường (liều lượng và cách dùng) để loại bỏ <i>Benedenia seriolae</i> |
| 2              | 300ppm                                | 6 phút         | Điều trị gấp đôi thời gian đã định                                                      |
| 3              | 75ppm                                 | 30 phút        | 1/4 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 4              | 50ppm                                 | 60 phút        | 1/6 nồng độ ở liều lượng thông thường                                                   |
| 5              | 0ppm                                  | 60 phút        | Khu đối chứng không được điều trị                                                       |

[0045] Kết quả và thảo luận

Thậm chí ngay sau khi điều trị bằng 300ppm hydro peroxit trong thời gian 3 và 6 phút, *Zeuxapta japonica* có cơ thể bị co chỉ một chút (Fig.10A) và không còn bị co nữa trong khoảng 10 phút sau khi điều trị (Fig.11). Trái lại, *Zeuxapta japonica* trong khu điều trị 75ppm x 60 phút bị co một cách rõ ràng trong thời gian 6-10 phút sau khi điều trị (Fig. 10B). Hơn thế nữa, tất cả các cá thể *Zeuxapta japonica* trong khu điều trị 75ppm x 60 phút bị co thậm chí khi sau 30 phút sau khi điều trị, và thậm chí trong khu điều trị 50ppm x 60 phút, chỉ một cá thể được hồi phục trong 30 phút sau khi điều trị. Sự co của *Zeuxapta japonica* trong các khu điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ thấp được quan sát không chỉ ở cơ thể mà còn ở giác bám mang nhiều giác hút sau (Fig. 10B).

Do việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ thấp với khoảng thời gian kéo dài đã làm cho *Zeuxapta japonica* bị co trong khoảng thời gian đủ dài và sự co là rất mạnh đến giác bám mang nhiều các giác hút sau, điều này cho thấy việc điều trị này có hiệu quả trừ ký sinh trùng ổn định hơn so với việc điều trị 300ppm x 3 phút hoặc 300ppm x 6 phút.

Trong khu đối chứng không được điều trị, không quan sát thấy sự co *Zeuxapta japonica* trong khoảng thời gian thử nghiệm này.



## Ví dụ 10

[0046] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng đến *Bivagina tai* của việc điều trị *in vivo* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp>

Phương pháp thử nghiệm: Năm mươi con cá *Pagrus major* được nuôi trong lồng ngoài trời được thử nghiệm. Nhóm cá này mỗi con có thể trọng trung bình khoảng 61g. *Pargus major* được chuyển từ lồng này vào thùng loại 1 tấn trên đất liền, từ đó chúng được đưa vào năm thùng loại 30-L, mỗi thùng chứa 15 L nước biển, sao cho mỗi thùng chứa 10 con cá. Để ngăn ngừa sự thiếu oxy, các thùng được sục khí bằng các bơm không khí nhỏ. Đối với các khu thử nghiệm tương ứng, lượng dung dịch hydro peroxit quy định được hòa tan trong 50 mL nước biển và được nạp vào thùng chứa cá, tiếp đó là khuấy trước khi cá được điều trị bằng cách ngâm trong khoảng thời gian cụ thể. Sau khi điều trị, mỗi thùng được làm nghiêng để thu gom cá vào túi lưới và khoảng 3L nước biển được đổ lên cá để rửa chúng. Sau đó, cá được đưa trở lại các thùng, mỗi thùng chứa 18L nước biển, trong đó chúng được giữ trong thời gian hàng giờ có sục khí. Sau đó, cá được lấy mẫu để đếm quần thể *Bivagina tai* ký sinh trong mang cá của chúng. Hiệu quả trừ ký sinh trùng được đánh giá bằng cách so sánh số quần thể ký sinh *Bivagina tai* trong các khu thử nghiệm tương ứng. Nước biển được sử dụng trong thử nghiệm này có nhiệt độ 23,2°C.

Các khu thử nghiệm: Xem Bảng 10 dưới đây.

[0047] Kết quả và thảo luận

Mức độ loại bỏ *Bivagina tai* trong khu điều trị 300ppm x 3 phút (theo liều lượng thông thường và dùng dung dịch hydro peroxit để loại bỏ *Bivagina tai*) là 64%. Ngay khi việc điều trị được bắt đầu trong khu này, cá bơi dữ dội khiến cho chúng nhảy lên trên bề mặt của nước. Hành vi này cho thấy rằng việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit nồng độ cao có thể gây độc hoặc kích thích *Pagrus major*. Mức độ loại bỏ trong khu điều trị 100ppm x 30 phút là 89% và trong khu điều trị bằng cùng nồng độ hydro peroxit trong thời gian 60 phút là 100%. Và mức độ loại bỏ trong khu điều trị 75ppm x 60 phút là 99%. Cá trong các khu điều trị bằng nồng độ thấp này bơi không thay đổi suốt trong quá trình điều trị, từ khi bắt đầu đến khi kết thúc, và không quan sát thấy có sự bất

thường nào ở cá.

Các kết quả này đã cho thấy rằng việc điều trị bằng dung dịch hydro peroxit có nồng độ thấp trong khoảng thời gian kéo dài có hiệu quả trừ ký sinh trùng cao đối với ký sinh trùng sống trong mang cá *Bivagina tai* mà không gây độc hoặc kích thích *Pagrus major*.

[0048] [Bảng 10]

| Khu thử nghiệm | Nồng độ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Thời gian ngâm | Số cá được thử nghiệm<br>Thể trọng cá | Số ký sinh trùng trưởng thành trên mỗi con cá <sup>a,b</sup> | Mức độ loại bỏ |
|----------------|---------------------------------------|----------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| 1              | 300ppm                                | 3 phút         | 10<br>57,5±11,8 g                     | 14,1±7,5*                                                    | 64%            |
| 2              | 100ppm                                | 30 phút        | 10<br>61,3±9,8 g                      | 4,4±2,4*                                                     | 89%            |
| 3              | 100ppm                                | 60 phút        | 10<br>63,3±4,9 g                      | 0,0±0,0*                                                     | 100%           |
| 4              | 75ppm                                 | 60 phút        | 10<br>62,2±7,9 g                      | 0,4±0,7*                                                     | 99%            |
| 5              | 0ppm                                  | —              | 10<br>61,2±7,3 g                      | 39,3±18,1                                                    | —              |

a: Số ký sinh trùng được biểu thị bằng giá trị trung bình ± SD.

b: Có sự khác biệt đáng kể so với số ký sinh trùng trong khu đối chứng (\* $P < 0,01$ ).

Ví dụ 11

[0049] <Hiệu quả trừ ký sinh trùng *Benedenia seriola*, *Neobenedenia girella* và *Zeuxapta japonica* của việc điều trị *in vivo* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp>

Phương pháp thử nghiệm: Bốn trăm con cá *Seriola dumerili* được nuôi cấy trong lồng ngoài trời và mỗi con nặng khoảng 430 g được thử nghiệm. Tấm ngăn dùng cho việc điều trị bằng dung dịch được nạp đầy 15 tấn nước biển, sau đó được nạp dung dịch hydro peroxit để nồng độ của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đạt 75ppm, tiếp đó là khuấy.

Ba trăm chín mươi con cá được đưa vào bể tắm này, ở đó chúng được ngâm trong 30 phút. Sau khi điều trị, cá được chuyển trở lại vào lồng. Việc lấy mẫu được thực hiện bằng cách thu gom mười con cá, mỗi con trước khi điều trị và vào ngày sau khi điều trị. Quần thể *Benedenia seriola* và *Neobenedenia girella* sống ký sinh trên bề mặt cơ thể cá và quần thể *Zeuxapta japonica* sống ký sinh trong mang cá được đếm. Hiệu quả trừ ký

sinh trùng được đánh giá bằng cách so sánh số ký sinh trùng trong các khu thử nghiệm tương ứng. Trong khi điều trị, nước biển được giữ ở nhiệt độ 28,5°C.

[0050] Kết quả và thảo luận

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây. Không phát hiện thấy có bất kỳ loại ký sinh trùng nào trong số *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girella* và *Zeuxapta japonica* ký sinh trên cá đã được điều trị và mức độ loại bỏ là 100% đối với mỗi loại ký sinh trùng.

Do vậy, sáng chế đã tỏ ra là có hiệu quả thậm chí khi nó được thực hiện trên trên quy mô lớn trong các điều kiện được sử dụng trong Ví dụ 11.

[0051] [Bảng 11]

| Ký sinh trùng               | Số ký sinh trùng trước khi điều trị trên mỗi con cá (n=10) | Số ký sinh trùng sau khi điều trị trên mỗi con cá (n=0) |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>Benedenia seriolae</i>   | 33,5±11,2                                                  | 0,0±0,0                                                 |
| <i>Neobenedenia girella</i> | 0,4±0,7                                                    | 0,0±0,0                                                 |
| <i>Zeuxapta japonica</i>    | 21,6±17,4                                                  | 0,0±0,0                                                 |

Ví dụ 12

[0052] <Thử nghiệm hiệu quả điều trị *Seriola dumerili* bằng dung dịch nước hydro peroxit ở nồng độ thấp bằng phương pháp Skirt >

Phương pháp thử nghiệm: Lồng (11,5 m x 11,5 m x 10 m) chứa mười nghìn con cá *Seriola dumerili*, mỗi con nặng khoảng 2 kg được bao bằng tấm ngăn dài 48m và rộng 10m và các đồ kẹp ở cả hai đầu của tấm ngăn được đóng lại để tạo ra một cái ống bao kín lồng. Trong nước biển trong ống làm bằng tấm ngăn này, dung dịch nước hydro peroxit được nạp vào trong 5 phút với lượng để tạo ra nồng độ trung bình là 35ppm, và sau khi hết 60 phút, tấm ngăn bao quanh lồng được lấy ra. Việc lấy mẫu được thực hiện bằng cách thu lấy 10 con cá, mỗi con trước khi điều trị và vào ngày sau điều trị. Quần thể *Benedenia seriolae* và *Neobenedenia girella* ký sinh trên bề mặt cơ thể cá (n=10) và quần thể *Zeuxapta japonica* ký sinh trong mang cá (n=5) được đếm. Hiệu quả trừ ký sinh trùng được đánh giá bằng so sánh số ký sinh trùng trong các khu thử nghiệm tương ứng.

Trong khi điều trị, nước biển được giữ ở nhiệt độ 26°C.

[0053] Kết quả và thảo luận

Nồng độ của dung dịch nước hydro peroxit là 35ppm ở lúc bắt đầu điều trị, 15ppm sau 30 phút, và 3ppm sau 60 phút, đã thấy rằng xảy ra hiện tượng nồng độ của dung dịch bị loãng dần. Số ký sinh trùng sống trên da cá (*Neobenedenia girella* và *Benedenia seriolae*) là  $110 \pm 48,3$  cá thể trên mỗi con cá trước khi điều trị và là  $28,9 \pm 24,3$  cá thể trên mỗi con cá sau khi điều trị. Số *Zeuxapta japonica* ký sinh là  $110,8 \pm 49,0$  cá thể trên mỗi con cá trước khi điều trị và là  $54,0 \pm 41,6$  con cá thể trên mỗi con cá sau khi điều trị. Do vậy, việc điều trị bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp cũng được xác nhận là có hiệu quả trong phương pháp ngăn trong các điều kiện như vậy mà nồng độ hoá chất được pha loãng.

**Khả năng áp dụng công nghiệp**

[0054] Trong phương pháp theo sáng chế, ngoại ký sinh trên cá có thể được loại bỏ một cách an toàn và hiệu quả hơn bằng cách sử dụng dung dịch nước hydro peroxit hiện đang được sử dụng ở các trang trại nuôi cá.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp loại bỏ ngoại ký sinh trùng có các giác hút hoặc các giác bám sống trên cá biển bằng dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ thấp, bao gồm bước ngâm cá biển này trong dung dịch nước hydro peroxit có nồng độ nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm trong thời gian nằm trong khoảng từ 15 phút đến 2 giờ khiến cho các giác hút hoặc các giác bám của ngoại ký sinh trùng này bị co lại hoặc biến dạng,

trong đó cá biển này thuộc bộ Perciformes và

trong đó ngoại ký sinh trùng này thuộc họ Capsalidae hoặc Diplectanidae trong bộ Monopisthocotylea hoặc họ Heteraxine, hoặc Microcotyloidea trong bộ Polypisthocotylea của lớp Monogenea trong ngành Platyhelminthes.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất các mặt của lưới lồng được bao quanh bằng tấm ngăn để tạo ra khu vực giữ nước biển bên trong, dung dịch nước hydro peroxit này được trộn lẫn vào nước biển trong lồng với lượng sao cho nồng độ trung bình theo tính toán nằm trong khoảng từ 30ppm đến 150ppm, và sau thời gian từ 15 phút đến 2 giờ, tấm ngăn này được lấy ra.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó thời gian ngâm nằm trong khoảng từ 15 đến 60 phút.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó cá biển là cá thuộc loài *Seriola* hoặc cá thuộc họ *Sparidae*.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó ngoại ký sinh trùng là *Benedenia seriolae*, *Benedenia epinepheli*, *Benedenia hoshinai*, *Benedenia sekii*, *Neobenedeniagirellae*, *Neobenedenia congeri*, *Lamellodiscus spp.*, *Zeuxapta japonica*, *Bivagina tai*, *Heteraxine heterocerca*, *Microcotyle sebastis*, hoặc *Microcotyle sebastisci*.

Fig. 1

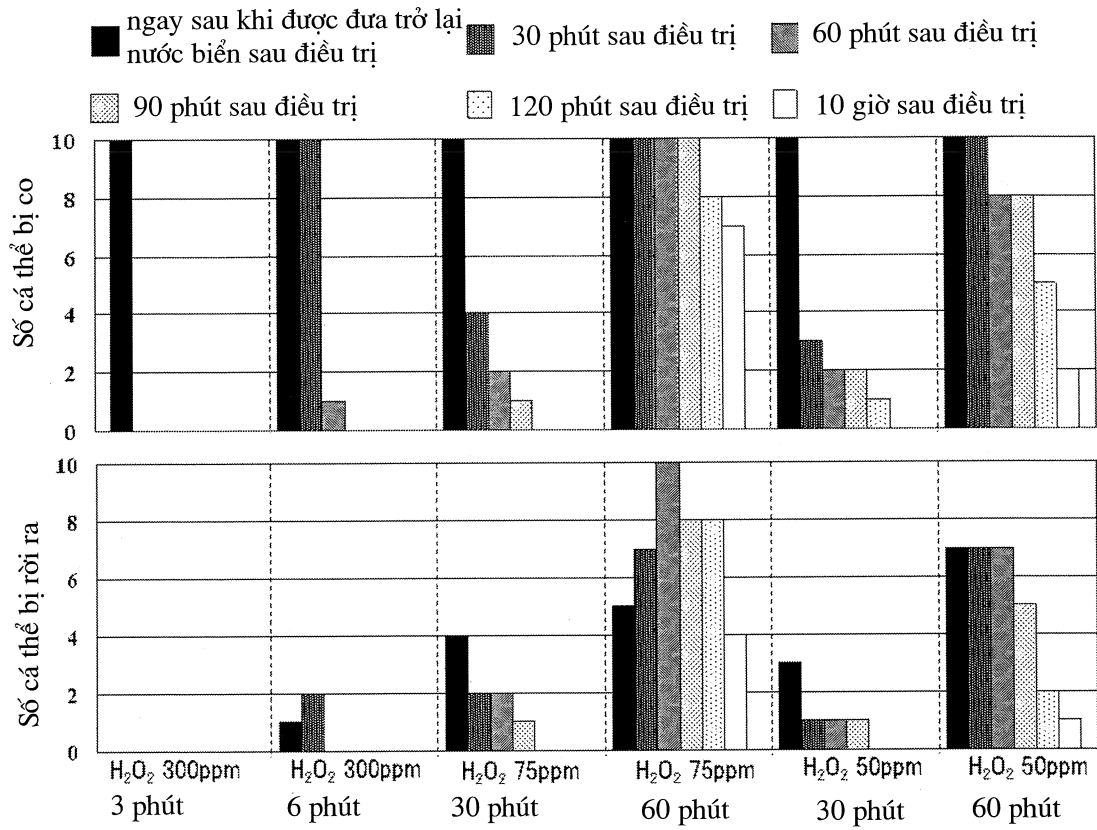


Fig. 2

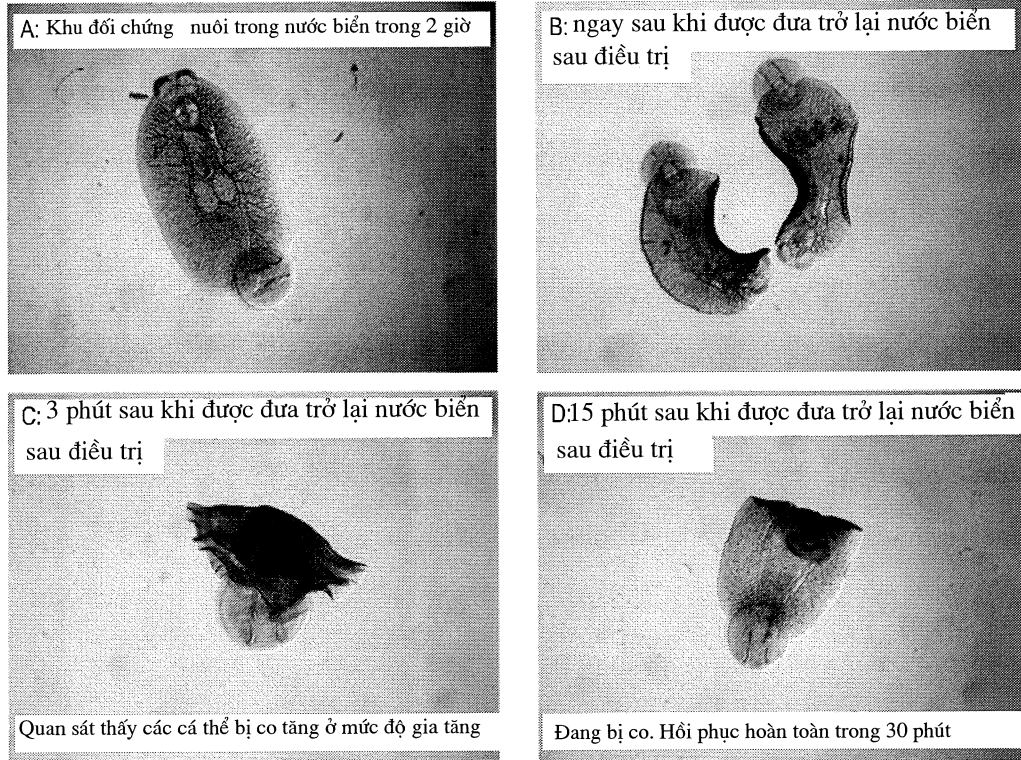


Fig. 3

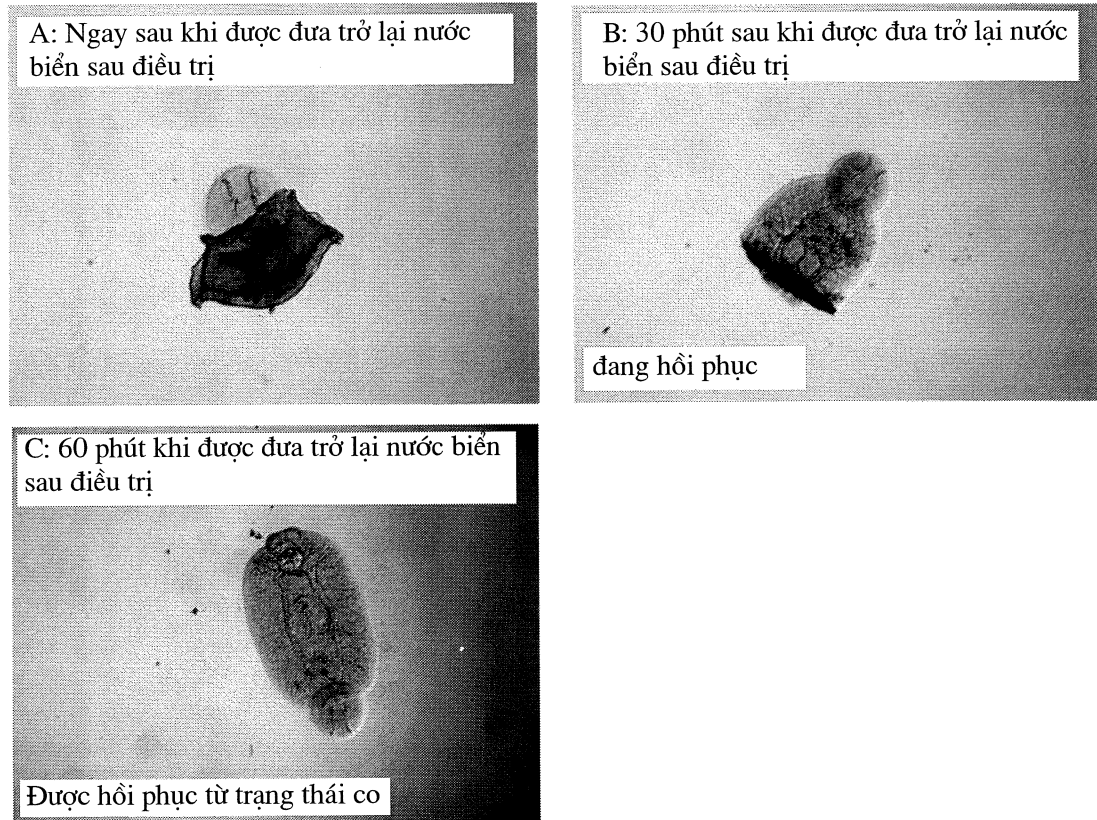




Fig. 4

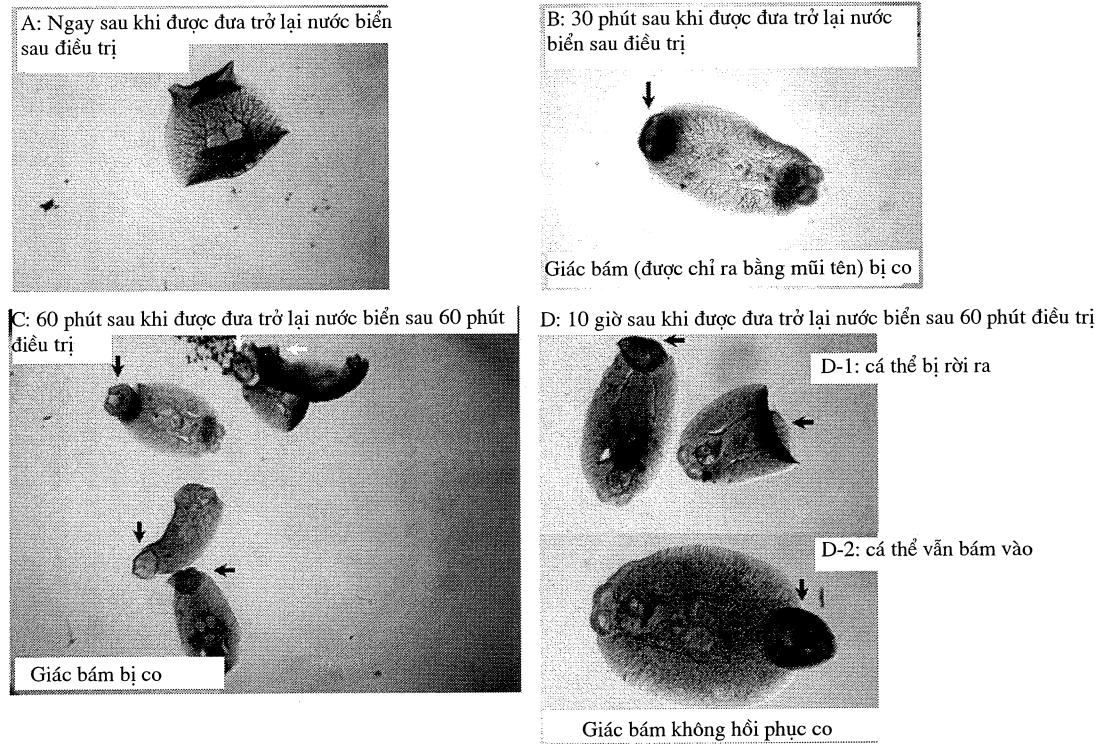


Fig. 5

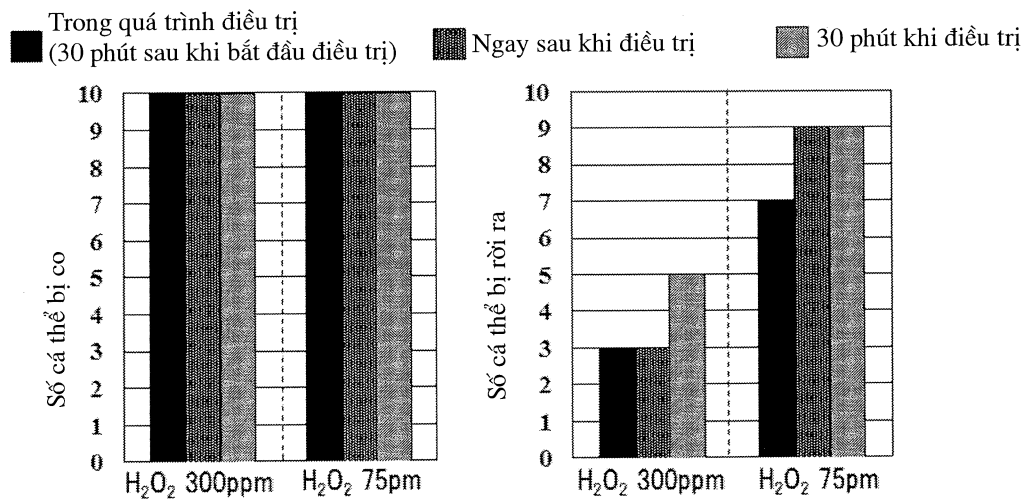


Fig. 6

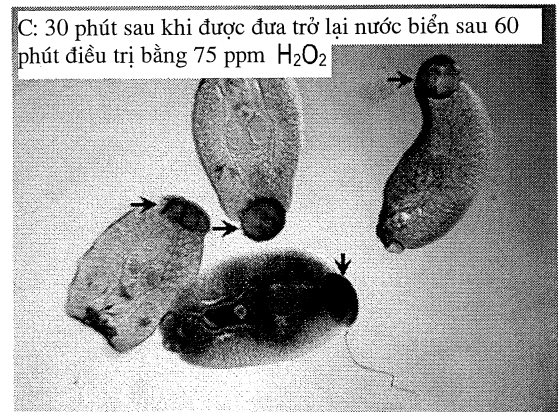
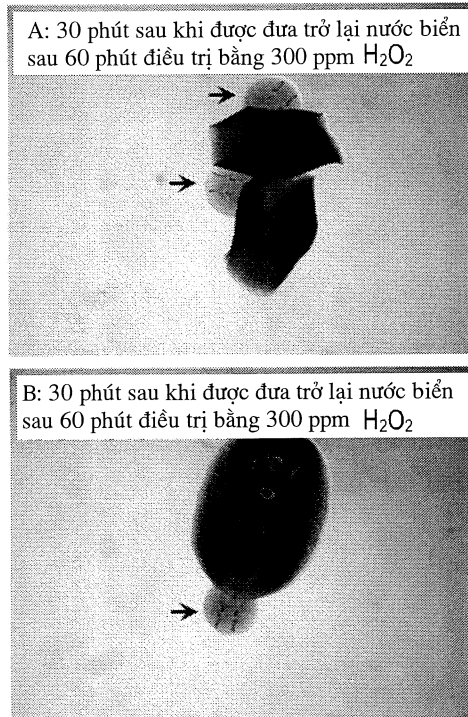
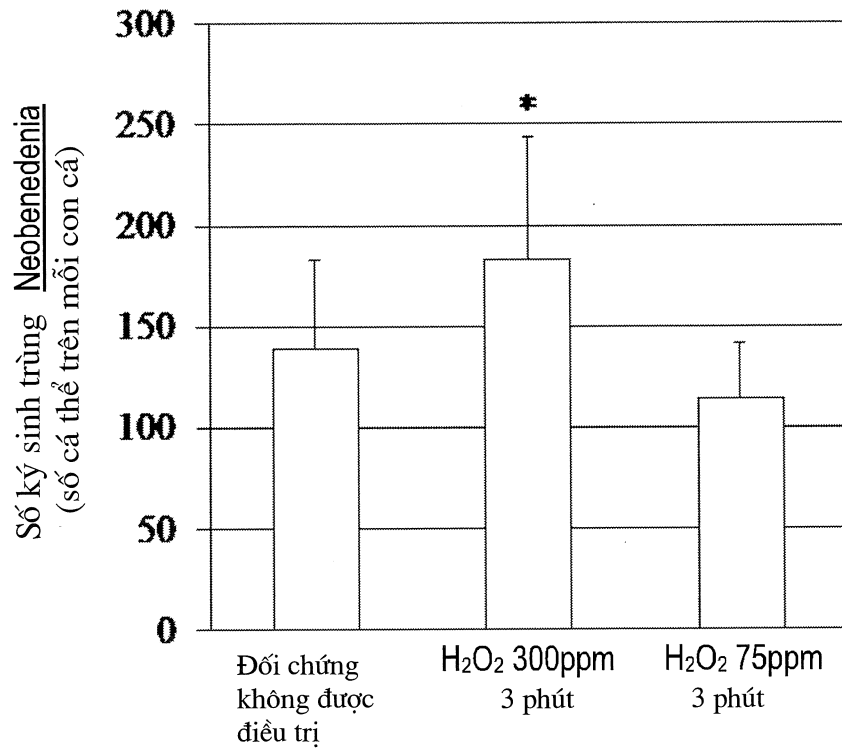


Fig. 7



Có sự khác biệt đáng kể so với khu đối chứng (\*P<0,05)

Fig. 8

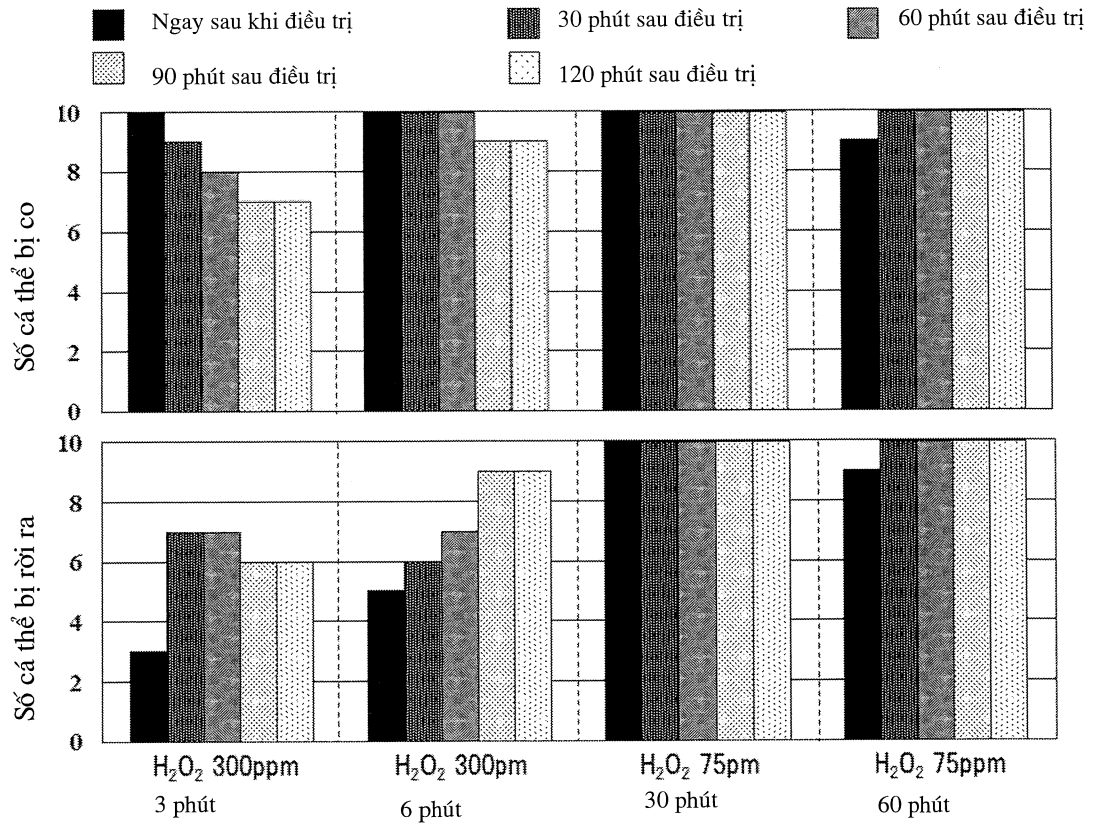


Fig. 9

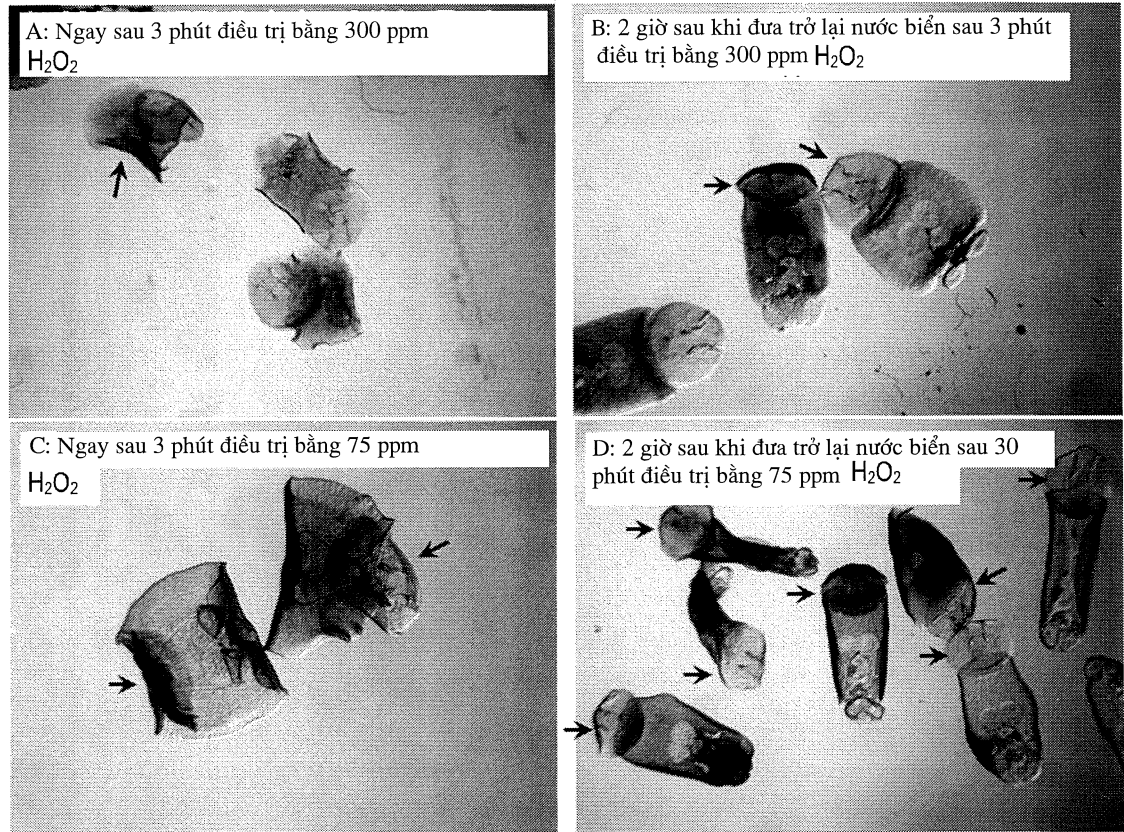


Fig. 10

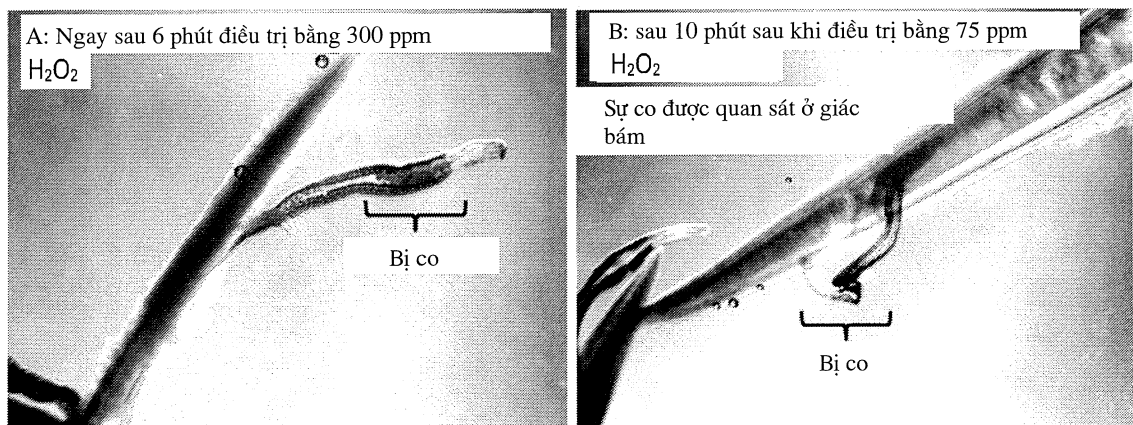


Fig. 11

