



(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) 
1-0019574

(51)⁷ **A23K 1/16, 1/18**

(13) **B**

(21)	1-2010-03092	(22)	24.04.2009
(86)	PCT/NO2009/000156 24.04.2009	(87)	WO2009/131467 29.10.2009
(30)	2008 1977 24.04.2008 NO		
(45)	27.08.2018 365	(43)	25.03.2011 276
(73)	1. EWOS INNOVATION AS (NO) N-4335 Dirdal, Norway 2. CHEMOFORMA LTD. (CH) Rheinstrasse 28-32, CH-4302 Augst, Switzerland		
(72)	VECINO, José, L., Gonzalez (ES), WADSWORTH, Simon (GB)		
(74)	Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)		

(54) **CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHO CÁ**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn chứa các thành phần thức ăn thông thường, peptidoglycan và nucleotit. Chế phẩm thức ăn này có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc làm giảm các bệnh nhiễm khuẩn và phòng ngừa các triệu chứng liên quan đến bệnh nhiễm khuẩn ở động vật. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp nuôi cá bằng cách cung cấp chế phẩm thức ăn này trong thời gian trước, trong hoặc sau khi nhiễm khuẩn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn, dùng để phòng ngừa hoặc làm giảm triệu chứng của các bệnh nhiễm khuẩn ở động vật và phương pháp nuôi cá.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Piscirickettsia salmonis là vi khuẩn nội bào dạng nhỏ gây ra bệnh nhiễm khuẩn máu làm chết cá hồi. Từ khi được phân lập vào cuối những năm 80 của thế kỷ trước, *P. salmonis* luôn là nguyên nhân chính làm chết cá hồi trong ngành công nghiệp thủy sản ở Chi-lê. Vì *P. salmonis* là vi khuẩn nội bào, nên hiệu quả của việc điều trị cá hồi bị nhiễm bệnh bằng thuốc kháng sinh là rất thấp. Việc phát triển vacxin cũng gặp khó khăn do bản chất nội bào của vi khuẩn này. Các vacxin kháng *P. salmonis* hiện hành thường mất hiệu lực sau 6 tháng từ khi chuyển từ nước ngọt sang nước mặn, và do vậy ngành công nghiệp này vẫn phụ thuộc rất nhiều vào thuốc kháng sinh, để điều trị bệnh này. Việc sử dụng chất diệt vi khuẩn, như axit oxolinic, đã được kéo dài trong nhiều năm ở Chi-lê, với lượng lên tới 130 tấn (hoạt chất) một năm. Trên 80% lượng này được sử dụng để phòng trừ *P. salmonis*, mặc dù không có chất diệt vi khuẩn nào tỏ ra có hiệu lực phù hợp.

Ngoài ra, việc điều trị bằng thuốc kháng sinh như oxytetracyclin và axit oxolinic có thể làm giảm một cách đáng kể các chức năng của hệ miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu của cá như cá hồi Atlantic chẳng hạn. Việc ức chế miễn dịch này làm tăng nguy cơ tái nhiễm các vi khuẩn gây bệnh như *P. salmonis*, dẫn đến việc tái xâm lấn nhanh của *P. salmonis* và nhu cầu dùng thuốc kháng sinh nhiều lần. Việc dùng lại thuốc kháng sinh kéo dài này càng làm giảm tính miễn dịch của cá và ảnh hưởng đến quần thể vi khuẩn tự nhiên trong các cơ quan như vi hệ thực vật ruột. Hiệu quả nuôi trồng và phát triển bị giảm là một trong số các tác dụng bất lợi của việc điều trị bằng thuốc kháng sinh trong hoàn cảnh này và vì vậy nó không chỉ là vấn đề kinh tế mà còn là vấn đề về ích lợi của ngành cá nói chung. Nhận thức của xã hội và người

tiêu dùng về ích lợi của ngành cá ngày càng phát triển làm gia tăng nhu cầu tìm ra các biện pháp điều trị và phòng ngừa sự bùng phát bệnh hữu hiệu trong sản xuất thủy sản.

Việc sử dụng thuốc kháng sinh liên tục cũng làm tăng mối lo ngại về dư lượng thuốc và tính an toàn thực phẩm. Hiện nay đã có qui định rằng tất cả các mẻ cá hồi đánh bắt được tại Chi-lê xuất khẩu cho thị trường Mỹ và Nhật bản phải được kiểm tra về dư lượng thuốc kháng sinh. Điều này khiến cho quần thể cá hồi Atlantic phải được dùng dùng thuốc hơn 2 tháng trước khi thu hoạch. Thời gian này là giai đoạn rất mạo hiểm và có thể gây ra tổn thất lượng cá lớn trong trường hợp nhiễm khuẩn nặng tất cả các loại bệnh. Ngoài ra, do không được sử dụng thuốc kháng sinh để phòng trừ bệnh, bất kỳ bệnh nhiễm khuẩn và tổn thất nào đối với quần thể trước khi thu hoạch này đều có thể bị phạt tài chính nặng.

Chất kích thích miễn dịch làm tăng đáp ứng miễn dịch của cá và có ứng dụng quan trọng trong ngành thủy sản, đặc biệt là khi được triển khai như một phần của chương trình bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Peptidoglycan (PG) là thành phần cấu trúc của thành tế bào vi khuẩn và có thể chiếm đến 90% khối lượng khô của vi khuẩn gram dương. PG chịu trách nhiệm về độ bền của tế bào, hình dáng và chống chịu áp suất thẩm thấu của tế bào chất. Chúng được tạo thành từ hai loại đường amino xen kẽ để tạo ra cấu trúc dạng mạng vững chắc. Do chúng có mặt trong nhiều vi khuẩn gây bệnh, PG tạo ra đáp ứng mạnh khi tiếp xúc với hệ miễn dịch của vật chủ. PG đã được chứng minh là cải thiện được khả năng chống lại các mầm bệnh ở các loài thủy sản trong giai đoạn chưa trưởng thành cũng như trưởng thành, bao gồm cá hồi, cá đuôi vàng, cá rô phi, cá bơn và tôm. Tuy nhiên, cũng phát hiện ra rằng việc dùng peptidoglycan có thể gây ra tác dụng bất lợi như làm giảm tỷ lệ sống, nếu nó không được dùng với liều tối ưu, như liều quá cao hoặc quá thấp và đặc biệt khi cho sinh vật dùng trong thời gian lâu dài. Trong ngành thủy sản, có lợi nếu chất kích thích miễn dịch mạnh này có thể được dùng trong thời gian lâu hơn thời gian khuyến cáo dựa trên các kiến thức và kinh nghiệm thử nghiệm hiện hành. Matsuo K. & Miyazono I. ("The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile Rainbow-trout. Nippon Suisan Gakkaishi 89 (8): 1377-1379, August 1993) thông báo rằng việc dùng PG qua đường miệng lâu hơn 28 ngày có thể dẫn đến việc giảm khả năng kháng bệnh.

Hầu hết các tế bào tạo ra nucleotit để sử dụng trong quá trình sao mã tế bào. Trong các điều kiện thông thường, trong các sinh vật sống quá trình tổng hợp nucleotit không ngừng được cân bằng một cách hợp lý với nhu cầu tự nhiên cần cho sự tăng sinh tế bào.

Vấn đề cần giải quyết là phát triển và đề xuất chế độ cho ăn và thức ăn chức năng đảm bảo sức khỏe mà không gây ra các tác dụng bất lợi nêu trên và cải thiện được tỷ lệ sống của cá trong thời gian khi cá đã hoặc đang bị tiếp xúc với tác nhân nhiễm khuẩn như *P. salmonis*, chẳng hạn. Thức ăn như vậy sẽ đem lại lợi ích kinh tế đáng kể cho cả nhà sản xuất cá và nhà sản xuất thức ăn. Ngoài ra, nó còn góp phần cải thiện ích lợi của ngành cá và có thể làm giảm nhu cầu và lượng thuốc kháng sinh sử dụng cùng với các nhược điểm đã biết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chứa các thành phần thức ăn thông thường, khác biệt ở chỗ, chế phẩm này còn chứa peptidoglycan và nucleotit.

Tốt hơn, nếu lượng peptidoglycan trong chế phẩm thức ăn nằm trong khoảng từ 0,001%-0,01%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,001%-0,005% và tốt nhất là 0,001% khối lượng.

Tốt hơn nữa, lượng nucleotit nằm trong khoảng từ 0,05% -1% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1%-0,5% khối lượng và tốt nhất là 0,2% khối lượng.

Tốt hơn, nếu tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 4, tốt hơn là lớn hơn 20 và tốt nhất là lớn hơn 40.

Tốt hơn, nếu tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 40.

Tốt hơn, nếu tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 20 và lượng peptidoglycan nằm trong khoảng từ 0,001%-0,01% khối lượng của chế phẩm thức ăn này.

Tốt hơn, nếu tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 40 và lượng peptidoglycan nằm trong khoảng từ 0,001%-0,01% khối lượng của chế phẩm thức ăn này.

Tốt hơn, nếu tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 20 và lượng peptidoglycan nhỏ hơn 0,01%, tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn 0,05%, tính trên khối lượng của chế phẩm thức ăn này.

Tốt hơn, nếu tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 40 và lượng peptidoglycan nhỏ hơn 0,01%, tốt hơn là 0,005% hoặc nhỏ hơn, tính trên khối lượng của chế phẩm thức ăn này.

Tốt hơn, nếu lượng nucleotit là 0,2% và lượng peptidoglycan là 0,005% tính trên tổng khối lượng của chế phẩm thức ăn này.

Tốt hơn, nếu nucleotit được chọn từ nhóm gồm adenosin monophosphat, xytidin monophosphat, guanosin monophosphat, uridin monophosphat, thymidin monophosphat.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này còn chứa các chất kích thích miễn dịch và/hoặc các thành phần kháng viêm khác.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chứa các thành phần thức ăn thông thường, nucleotit và peptidoglycan được sử dụng làm chế phẩm thực phẩm chức năng để phòng ngừa hoặc làm giảm triệu chứng liên quan đến bệnh nhiễm khuẩn ở động vật.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn chứa các thành phần thức ăn thông thường và peptidoglycan được sử dụng làm chế phẩm thực phẩm chức năng để phòng ngừa hoặc làm giảm triệu chứng liên quan đến bệnh nhiễm khuẩn ở động vật, trong đó nồng độ của lượng peptidoglycan nằm trong khoảng từ 0,01 g kg⁻¹ đến 0,05 g kg⁻¹ thức ăn.

Tốt hơn, nếu chế phẩm thức ăn theo khía cạnh thứ hai và thứ ba được sử dụng làm tăng tỷ lệ sống và/hoặc tốc độ phát triển ở cá có nguy cơ nhiễm khuẩn.

Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm này được sử dụng trong trường hợp khi bệnh nhiễm khuẩn do các vi khuẩn như *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp, bệnh viêm miệng, nhiễm khuẩn liên cầu, vi khuẩn phẩy; bệnh tuyến tụy, NSAV, viêm mang (GI), viêm tim và cơ xương (HSMI), do virus hoại huyết cá hồi (ISA), nấm thủy mi và rận biển gây ra.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này được sử dụng, khi động vật là động vật thủy sinh và tốt hơn khi động vật thủy sinh là cá, loài giáp xác hoặc động vật thân mềm. Cá có thể là cá hồi, cá bẹt hoặc các loài cá canh tác khác bất kỳ và cá thích hợp nhất là cá hồi Atlantic *Salmo salar*.

Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm này được sử dụng để bào chế thuốc nhằm phòng ngừa và/hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ở động vật và/hoặc chế phẩm dinh dưỡng và/hoặc thực phẩm chức năng và/hoặc để làm giảm các triệu chứng của bệnh.

Chế phẩm này có thể cũng được sử dụng để phục hồi một cách hữu hiệu sau khi nhiễm khuẩn và/hoặc điều trị nhiễm khuẩn bằng thuốc kháng sinh và/hoặc làm giảm nguy cơ tái nhiễm.

Chế phẩm này có thể cũng được sử dụng để cải thiện việc điều trị nhiễm khuẩn kết hợp với thuốc kháng sinh và/hoặc trước khi điều trị bằng thuốc kháng sinh.

Theo khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp nuôi cá dễ bị nhiễm khuẩn, khác biệt ở chỗ chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-5 được cho cá ăn trong thời gian trước, trong hoặc sau khi cá bị nhiễm bệnh.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này được cho ăn trong thời gian nằm trong khoảng từ 1-12 tuần trước khi nhiễm khuẩn, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2-6 tuần, tốt nhất là 4 tuần.

Theo cách khác, cá có thể được cho ăn chế phẩm thức ăn thông thường chứa thêm nucleotit trong thời gian đã định tiếp đó nuôi bằng chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-12.

Tốt hơn, nếu chế phẩm thức ăn này chứa thêm nucleotit được cho ăn trong thời gian nằm trong khoảng từ 1-8 tuần, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 4 tuần, tốt nhất là 3 tuần.

Tốt hơn, nếu chế phẩm thức ăn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-12 được cho ăn trong thời gian nằm trong khoảng từ 1-12 tuần, tốt nhất là 1 tuần.

Tốt hơn, nếu phương pháp được nêu phương pháp yêu cầu bảo hộ được áp dụng khi bệnh nhiễm khuẩn là bệnh gây ra bởi vi khuẩn như *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp, bệnh viêm miệng, nhiễm khuẩn liên cầu, vi khuẩn phẩy; bệnh tuyến tụy, NSAV, viêm mang (GI), viêm tim và cơ xương (HSMI), do virus hoại huyết cá hồi (ISA), nấm thủy mi và rận biển gây ra.

Các phương án được ưu tiên cũng được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án theo sáng chế sẽ được đề cập, bằng các ví dụ có tham khảo hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 thể hiện tỷ lệ gây chết tích lũy (giá trị trung bình $\pm$ SEM) trong thử nghiệm 1 trong giai đoạn hậu nhiễm của cá hồi Atlantic (*Salmo salar*) được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trong pha tiền nhiễm.

Hình 2 thể hiện đường cong tỷ lệ sống Kaplan-Meier (Tỷ lệ phần trăm tương đối của tỷ lệ sống, giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình) của cá hồi Atlantic (*Salmo salar*) trong giai đoạn hậu nhiễm (thử nghiệm 1) sau khi được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trong pha tiền nhiễm.

Hình 3 thể hiện tỷ lệ gây chết tích lũy (%) (giá trị trung bình $\pm$ SDEV) của cá hồi Atlantic (*Salmo salar*) trong thử nghiệm 2 được biểu hiện dưới dạng dãy thời gian. Cá được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trước khi nhiễm *Piscirickettsia salmonis*.

Hình 4 thể hiện tỷ lệ gây chết tích lũy (%) (giá trị trung bình $\pm$ SEM) của cá hồi Atlantic (*Salmo salar*) trong thử nghiệm 2 được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ gây chết

cuối cùng sau pha hậu nhiễm. Cá được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trước khi nhiễm *Piscirickettsia salmonis*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa các thuật ngữ:

Thuật ngữ *peptidoglycan* bao gồm tất cả các hợp chất được đề cập và không được đề cập thuộc về nhóm chất peptidoglycan.

Nucleotit bao gồm phospho este đã biết bất kỳ của nucleosit như AMP, GMP, UMP, CMP, UMP.

Các thành phần thức ăn thông thường là các thành phần thức ăn thường được sử dụng trong chế phẩm thức ăn cho riêng động vật như lipid, protein, vitamin, hydrat cacbon, chất khoáng, v.v..

Thực phẩm chức năng có thể có hình thức giống hoặc có thể là thực phẩm thông thường được sử dụng như một phần của thức ăn thông thường và được chứng minh là có lợi ích sinh lý và/hoặc làm giảm nguy cơ của một số bệnh ngoài chức năng dinh dưỡng, có nghĩa là chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như nucleotit và peptidoglycan.

Cá hồi là cá thuộc về họ cá hồi. Ví dụ đại diện là cá hồi Atlantic (*Salmo salar*), cá hồi vân (*Onchorynchus mykiss*), cá hồi bạc (*Onchorynchus kisutch*).

Thuật ngữ *bệnh nhiễm khuẩn* bao gồm các bệnh nhiễm khuẩn thông thường đã biết của động vật, chẳng hạn do vi khuẩn như *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp., bệnh viêm miệng, nhiễm khuẩn liên cầu, vi khuẩn phẩy; bệnh tuyến tụy, NSAV, viêm mang (GI), viêm tim và cơ xương (HSMI), do virus hoại huyết cá hồi (ISA), nấm thủy mi và rận biển gây ra.

Thuật ngữ *phục hồi* có nghĩa là tình trạng sức khỏe của động vật hồi phục sau khi nhiễm bệnh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thử nghiệm 1

Tổng số 640 con cá hồi Atlantic *Salmo salar* (160 con cá trong một nhóm), giới tính lẫn lộn, trọng lượng ban đầu 80g, được điều chỉnh giống nước biển, được nuôi trong thời gian 4 tuần at 2% thể trọng trong một ngày. Trên thực tế, cá được ăn thoải mái. Cá được nuôi in 6 bể. Cá were đánh dấu từ to xác định the các nhóm khác nhau, trước khi bắt đầu the thời gian nuôi. Cá được nuôi trong nhiệt độ môi trường nước biển (16°C). Tỷ lệ chết được đánh giá hàng ngày.

Có 4 nhóm thử nghiệm thức ăn khác nhau trong giai đoạn tiền nhiễm (Bảng 3) bao gồm 5 thức ăn khác nhau (Bảng 1). Ba nhóm cá được nuôi bằng thức ăn chứa nucleotit trong 3 tuần, tiếp đó ba thức ăn khác nhau chứa peptidoglycan với nồng độ khác nhau và nucleotit trong một tuần. Nhóm đối chứng nhận thức ăn thương phẩm trong toàn bộ giai đoạn tiền nhiễm 4 tuần. Tất cả thức ăn chứa các thành phần thức ăn thông thường và chỉ khác nhau về lượng peptidoglycan và nucleotit bổ sung vào (Bảng 2).

Gây nhiễm bằng *Piscirickettsia salmonis* và việc cho ăn hậu nhiễm

Vào thời điểm 24 giờ sau khi cho ăn lần cuối trong giai đoạn tiền nhiễm cá được trộn với lượng như nhau thành 6 bể với 25 con cá một nhóm mỗi bể (tổng số 100 con cá mỗi bể). Cá được gây nhiễm bằng liều gây chết (LD₅₀) là 0,2 ml *Piscirickettsia salmonis* bằng cách tiêm trong màng bụng. Sau khi cá nhiễm được nuôi cùng thức ăn đối chứng không bổ sung nucleotit hoặc peptidoglycan trong 30 ngày (hậu nhiễm) khi thử nghiệm được dừng lại và tỷ lệ chết cuối cùng được đánh giá.

Bảng 1: Thức ăn thử nghiệm được sử dụng trong thử nghiệm 1. PG = peptidoglycan.

Thức ăn số	Tên thức ăn
1.	Thức ăn đối chứng (Thương phẩm)
2.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit và PG 0,005%; (50g PG tấn ⁻¹)
3.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit và PG 0,01%; (100g PG tấn ⁻¹)
4.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit và PG 0,05%; (500g PG tấn ⁻¹)
5.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit

Bảng 2: Các thành phần thức ăn chủ yếu và phân tích hoá học chế phẩm của thức ăn thử nghiệm trong thử nghiệm 1.

Thành phần (% khối lượng)	Thức ăn 1	Thức ăn 2	Thức ăn 3	Thức ăn 4	Thức ăn 5
Bột cá	51	51	51	51	51
Dầu cá	18	18	18	18	18
Gluten lúa mì	7	7	7	7	7
Chế phẩm thực phẩm chức năng	8	8	8	8	8
Vitamin premix*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mineral premix**	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Peptidoglycan	-	0,005	0,01	0,05	-
Nucleotit	-	0,2	0,2	0,2	0,2
Thành phần (%)					
Protein	47,9	47,9	47,9	47,9	47,9
Lipit	24,3	24,3	24,3	24,3	24,3
Tro	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Khối lượng khô	92,7	92,7	92,7	92,7	92,7

*EWOS Vitamin premix®

**EWOS Mineral premix®.

Bảng 3. Chế độ cho ăn thức ăn thử nghiệm trong thử nghiệm 1 trước khi nhiễm *Piscirickettsia salmonis* (tiền nhiễm) và sau khi nhiễm *P. salmonis* (hậu nhiễm).

Điều trị	Tiền nhiễm				Hậu nhiễm
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	30 ngày
1 (đối chứng)	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1
2	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 2	
3	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 3	
4	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 4	

Đánh giá LD₅₀

Liều chính xác để xác định tỷ lệ gây chết 50% quần thể (LD₅₀) được đánh giá trước khi nhiễm chính. Tổng số 220 con cá (*Salmo salar*) từ cùng nguồn cá được sử dụng trong thử nghiệm nuôi dưỡng được phân bố trong 4 bể x 700L. Cá có trọng lượng trung bình nằm trong khoảng từ 120 đến 150g (55 con cá mỗi bể). Các bể được cung cấp nước biển ở nhiệt độ trong phòng. Ngay khi cá được điều chỉnh đến các điều kiện bể chúng được tiêm (0,2 ml/con, tiêm trong màng bụng, bụng giữa) với 4 nồng độ pha loãng có độ chuẩn *P. salmonis* PSLT8 đã biết (1/10, 1/100, 1/1000 & 1/10.000). Nhiệt độ nước và số liệu cá được tiêm bị chết được ghi lại trong thời gian 30 ngày. Giá trị ước tính của LD₅₀ được tiến hành song song với thời gian nuôi bằng các thức ăn khác nhau.

Số liệu thống kê

Tỷ lệ chết được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ gây chết tích lũy (%). Số liệu được đánh giá bằng cách sử dụng phương trình phân tích tỷ lệ sống Kaplan-Meier, ngoài thử nghiệm Log Rank & Wilcoxon (Minitab 13.32, State College, PA, USA). Tỷ lệ sống tương đối (RPS) được tính như sau:

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{Số bị chết trong nhóm thử nghiệm}}{\text{Số bị chết trong nhóm đối chứng}}\right) \times 100$$

Kết quả và bàn luận

Cá được nuôi bằng nucleotit và peptidoglycan (PG) có tỷ lệ sống tương đối (RPS) cao hơn đáng kể đến khi kết thúc nghiên cứu sau 30 ngày hậu nhiễm (Bảng 4, Hình 2) (thử nghiệm Log-Rank: $p < 0,001$; thử nghiệm Wilcoxon: $p < 0,001$) so với cá dùng thức ăn đối chứng. Xác suất sống sót trong nhóm đối chứng nhỏ hơn 49%, so với 69%, 72% và 75% trong nhóm lần lượt dùng nucleotit và PG 0,05%, nucleotit và PG 0,01% và nucleotit và PG 0,005% (Hình 2). Không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ chết giữa nhóm dùng thức ăn chứa hỗn hợp nucleotit và peptidoglycan, mặc dù quan sát thấy rõ xu hướng là tỷ lệ chết nhỏ hơn khi dùng liều nhỏ hơn (Hình 1). Quan sát thấy rằng độ lệch thấp về tỷ lệ chết giữa các bể và không có sự khác biệt đáng kể giữa tác dụng bể (thử nghiệm Log-Rank: $p=0,906$; thử nghiệm Wilcoxon: $p=0,952$).

Bảng 4: Tỷ lệ sống tương đối (RPS) và tỷ lệ chết vào cuối pha hậu nhiễm (giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình) của cá hồi Atlantic (*Salmo salar*) được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trước khi nhiễm *P. salmonis*. *có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,001$ so với đối chứng).

Nhóm	RPS (%)	Tỷ lệ chết (%)
1 (đối chứng)	-	$51 \pm 1,23$
2	51	$25 \pm 1,33^*$
3	46	$28 \pm 1,79^*$
4	40	$31 \pm 2,40^*$

Thử nghiệm 2

Tổng số 900 con cá hồi Atlantic *Salmo salar* (150 con trong điều trị, 6 điều trị), trọng lượng ban đầu 80g, được điều chỉnh giống nước biển, được đánh dấu từ để xác định các nhóm khác nhau, trước khi bắt đầu thời gian nuôi. Cá được nuôi trong nhiệt độ môi trường nước biển (13°C). Cá được nuôi trong thời gian 8 tuần với tỷ lệ tăng 2% thể trọng trong một ngày với sáu loại thức ăn khác nhau có thành phần khác nhau: thức ăn đối chứng không có các thành phần bổ sung, thức ăn chứa nucleotit, thức ăn chứa peptidoglycan và thức ăn chứa hỗn hợp nucleotit và peptidoglycan (Bảng 5). Ngoại trừ nucleotit và/hoặc peptidoglycan bổ sung, tất cả thức ăn đều chứa các thành phần thức ăn thông thường (Bảng 6). Trên thực tế, cá được ăn thoải mái.

Bảng 5: Thức ăn thử nghiệm được sử dụng trong thử nghiệm 2. PG = peptidoglycan.

Thức ăn số	Tên thức ăn
1.	Thức ăn đối chứng (Thương phẩm)
2.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit
3.	Thức ăn chứa PG 0,005%; (50g PG tấn ⁻¹)
4.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit + PG 0,005% (50g PG tấn ⁻¹)
5.	Thức ăn chứa 0,2% nucleotit + PG 0,001% (10g PG tấn ⁻¹)

Bảng 6: Các thành phần thức ăn chủ yếu và phân tích hoá học của các thành phần của thức ăn thử nghiệm trong thử nghiệm 2.

Thành phần (% khối lượng)	Thức ăn 1	Thức ăn 2	Thức ăn 3	Thức ăn 4	Thức ăn 5
Bột cá	51	51	51	51	51
Dầu cá	18	18	18	18	18
Gluten lúa mì	7	7	7	7	7
Bột gluten ngô	8	8	8	8	8
Vitamin premix*	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mineral premix**	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Peptidoglycan	-	-	0,005	0,005	0,001
Nucleotit	-	0,2	-	0,2	0,2
Thành phần (%)					
Protein	47,6	47,6	47,6	47,6	47,6
Lipit	24,3	24,3	24,3	24,3	24,3
Tro	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Khối lượng khô	92,7	92,5	92,7	92,5	92,7

*EWOS Vitamin premix®

**EWOS Mineral premix®.

Cá được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trong pha tiền nhiễm gồm 4 tuần (Bảng 7): nhóm 1 nhận thức ăn đối chứng không có các thành phần bổ sung bất kỳ

trong 4 tuần của giai đoạn tiền nhiễm. Nhóm 2 nhận thức ăn được bổ sung nucleotit trong 4 tuần. Trong nhóm 3, cá được nuôi bằng thức ăn đối chứng trong 3 tuần, tiếp đó nuôi bằng thức ăn chứa 0,005% PG trong 1 tuần. Trong nhóm 4 và 5, cá được nuôi bằng thức ăn chứa nucleotit trong 3 tuần, tiếp đó nuôi bằng thức ăn chứa các hỗn hợp nucleotit và peptidoglycan khác nhau (0,005% PG đối với nhóm 4 và 0,001% PG đối với nhóm 5) trong 1 tuần. Trong nhóm 6, cá được nuôi bằng thức ăn chứa hỗn hợp nucleotit và peptidoglycan trong 4 tuần. Sau giai đoạn tiền nhiễm, cá được gây nhiễm bằng *P. salmonis* như được mô tả cụ thể dưới đây.

Trong giai đoạn hậu nhiễm, tất cả các nhóm được nuôi bằng thức ăn đối chứng trong 4 tuần cho đến khi thử nghiệm kết thúc.

Bảng 7. Chế độ cho ăn trong thử nghiệm 2 trước khi cá được gây nhiễm bằng *Piscirickettsia salmonis* (tiền nhiễm) và sau khi gây nhiễm bằng *P. salmonis* (hậu nhiễm). Đối chứng dương tính và âm tính là thức ăn thưng phẩm thông thường được bổ sung nucleotit (Thức ăn 2) và không bổ sung nucleotit (Thức ăn 1).

Nhóm	Tiền nhiễm				Hậu nhiễm			
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5	Tuần 6	Tuần 7	Tuần 8
1	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1			
2	Thức ăn 2	Thức ăn 2	Thức ăn 2	Thức ăn 2				
3	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 1	Thức ăn 3				
4	Thức ăn 2	Thức ăn 2	Thức ăn 2	Thức ăn 4				
5	Thức ăn 2	Thức ăn 2	Thức ăn 2	Thức ăn 5				
6	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 5	Thức ăn 5				

Gây nhiễm bằng *Piscirickettsia salmonis*

Sau bốn tuần được nuôi bằng thức ăn thử nghiệm (giai đoạn tiền nhiễm), cá được phân bố đều vào 6 bể với 25 con cá trong một nhóm mỗi bể (tổng số 150 con cá mỗi bể). Cá được gây nhiễm bằng liều lượng 0,2 ml dự đoán để làm chết 50% quần thể (LD_{50}) *Piscirickettsia salmonis* bằng cách tiêm trong màng bụng (i.p.). Cá được nuôi bằng thức ăn đối chứng trong suốt nhiễm thời gian. Cá chết được loại bỏ hàng ngày và ghi lại.

Đánh giá LD_{50} :

Việc ước tính LD_{50} được thực hiện như được mô tả trong thử nghiệm 1 theo kiểu song song với thời gian nuôi bằng các thức ăn khác nhau. Trọng lượng trung bình của cá để đánh giá LD_{50} là 80g (55 con cá mỗi bể).

Số liệu thống kê

Đánh giá thống kê được tiến hành như được mô tả trong thử nghiệm 1.

Kết quả và bàn luận

Liều LD_{50} được dùng để đạt được tỷ lệ gây chết 50% trong quần thể mẫu đối chứng. Tỷ lệ chết đối chứng cuối cùng đạt đến 53% (Bảng 8, Hình 4). Không có sự khác biệt đáng kể về tác dụng của bể trong nghiên cứu nhiễm hiện hành ($p=0,967$).

Vào ngày hậu nhiễm thứ 14 tỷ lệ chết vượt qua 10% trong nhóm đối chứng (Hình 3). Trong các nhóm được nuôi bằng peptidoglycan tỷ lệ chết đạt đến 10% sau 21 ngày hậu nhiễm. Việc bổ sung nucleotit riêng rẽ cũng làm chậm, cũng như làm giảm tỷ lệ chết nói chung (Hình 4), tuy nhiên không hữu hiệu như trong trường hợp kết hợp peptidoglycan và nucleotit. Cá nhận thức ăn chỉ chứa nucleotit ở dạng chất bổ trợ có tỷ lệ sống tương đối (RPS) là 45% (Bảng 8) và xác suất sống sót cao hơn đáng kể ($p<0,001$, Log Rank-Wilcoxon) so với nhóm đối chứng nhận thức ăn đối chứng không có bất kỳ chất bổ trợ nào.

Tất cả các nhóm nhận peptidoglycan có xác suất sống cao hơn đáng kể ($p>0,001$, Log Rank-Wilcoxon) với trị số RPS nằm trong khoảng từ 66% đến 78% so với nhóm dùng thức ăn đối chứng. (Bảng 8, Hình 3).

Bảng 8. Tỷ lệ chết và tỷ lệ sống tương đối (RPS) của cá hồi Atlantic (*Salmo salar*) được nuôi bằng các thức ăn khác nhau trước khi nhiễm *Piscirickettsia salmonis*. SEM= Sai số chuẩn trung bình.

Nhóm	Tỷ lệ chết trung bình (%)	SEM	RPS
1 (đối chứng)	53,33	1,33	-
2	29,33	1,69	45
3	18,00	1,71	66
4	16,67	1,23	69
5	16,67	1,91	69
6	12,00	1,03	78

Tất cả các nhóm peptidoglycan có xác suất sống khác đáng kể với nhóm dùng chỉ nucleotit ở dạng chất bổ trợ ($p < 0,05$, Log Rank-Wilcoxon).

Cá được nuôi bằng thức ăn chứa hỗn hợp của nucleotit và peptidoglycan (nhóm 4, 5 và 6) trong pha tiền nhiễm có xác suất sống cao hơn từ 3-12% so với cá được nuôi bằng thức ăn chỉ chứa peptidoglycan (nhóm 3) không bổ sung nucleotit.

Không có sự khác biệt về tỷ lệ sống giữa cá được nuôi bằng thức ăn chứa nucleotit trong 3 tuần, tiếp đó nuôi bằng thức ăn chứa nucleotit cùng với lượng peptidoglycan khác nhau (0,001% PG hoặc 0,005% PG). Tuy nhiên, tỷ lệ sống hậu nhiễm cao nhất bất ngờ đạt được khi cá được nuôi bằng hỗn hợp gồm peptidoglycan với hàm lượng thấp (0,001% PG) cùng với nucleotit trong toàn bộ giai đoạn tiền nhiễm 4 tuần (nhóm 6).

Kết luận từ thử nghiệm 1 và 2:

Cho ăn hỗn hợp của nucleotit và peptidoglycan trong thử nghiệm 1 làm tăng một cách đáng kể khả năng kháng *Piscirickettsia salmonis*, so với đối chứng âm (thức ăn thương phẩm). Không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ sống giữa các nhóm thử nghiệm (peptidoglycan + nucleotit) mặc dù có xu hướng gia tăng tỷ lệ sống với liều nhỏ hơn trong thử nghiệm 1.

Zhou và các đồng tác giả (2006; “Effects of dietary supplementation of A30-peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)”, Aquaculture 251, 172-181) xác định được liều 4g kg⁻¹ là liều tối ưu của peptidoglycan cho cá bơn Nhật Bản (*Paralichthys olivaceus*), sau khi gây nhiễm bằng *Vibrio anguillarum*. Cả liều nhỏ hơn và cao hơn 4g kg⁻¹ được thông báo đều làm tăng tỷ lệ chết. Tác dụng của khoảng liều tương tự được quan sát với tôm rắng (*Penaeus monodon*) trong đó tỷ lệ sống được cải thiện với liều tối ưu nhỏ hơn (Boonyaratpalin S. và các đồng tác giả (1995) “Effects of peptidoglycan prepared from *Brevibacterium lactofermentum* on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.” In: Disease in Asian Aquaculture II. M. Shariff, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe (eds.), p. 469-477. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines).

Bất ngờ là, các tác giả sáng chế chứng tỏ rằng nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5g-0,01g PG kg⁻¹ thức ăn cùng với nucleotit là hữu hiệu để cải thiện một cách đáng kể tỷ lệ sống của cá bị nhiễm bệnh trong thử nghiệm 1 và 2. Ngoài ra, peptidoglycan là hữu hiệu khi được nuôi với nồng độ thấp đến 0,05g kg⁻¹ để cải thiện tỷ lệ sống hậu nhiễm trong thử nghiệm 2 mà không cần bổ sung nucleotit.

Việc dùng peptidoglycan cùng với nucleotit qua đường miệng trong giai đoạn tiền nhiễm trong thử nghiệm 2 đem lại sự bảo vệ đáng kể về tỷ lệ sống của cá vào cuối giai đoạn hậu nhiễm lên tới 78% RPS (xác suất sống $p < 0,001$, Log Rank-Wilcoxon).

Kết quả tốt nhất đạt được khi peptidoglycan được dùng cho cá với hàm lượng thấp (0,001% PG; liều cuối cùng 6 mg kg⁻¹ thể trọng) cùng với nucleotit trong toàn bộ pha tiền nhiễm.

Kết quả của các thử nghiệm cho thấy rằng hàm lượng nucleotit thích hợp được dùng cùng với chất kích thích miễn dịch đem lại có lợi cho cá trong giai đoạn có nguy cơ hoặc bắt buộc bị nhiễm. Tác dụng này có thể là do nucleotit bị giới hạn khi quần thể tế bào tăng nhanh chóng, ví dụ trong thời gian gây kích thích hệ miễn dịch.

Tác dụng âm tính đối với hệ miễn dịch do việc tiếp xúc quá mức với peptidoglycan đã được thông báo trong các tài liệu chuyên ngành. Matsuo & Miyazono, (1993) thông báo rằng việc dùng PG qua đường miệng với liều 0,2 và 2

mg/kg làm tăng khả năng kháng bệnh của cá hồi vân đối với *V. anguillarum* nhưng việc dùng lâu hơn 28 ngày có thể làm giảm khả năng kháng bệnh.

Kết quả của các thử nghiệm cho thấy rằng nucleotit có thể bù cho tác dụng âm tính liên quan đến việc dùng peptidoglycan quá nhiều và/hoặc quá lâu.

Sáng chế vì vậy rất quan trọng trong việc cải thiện việc chăm sóc sức khỏe của cá.

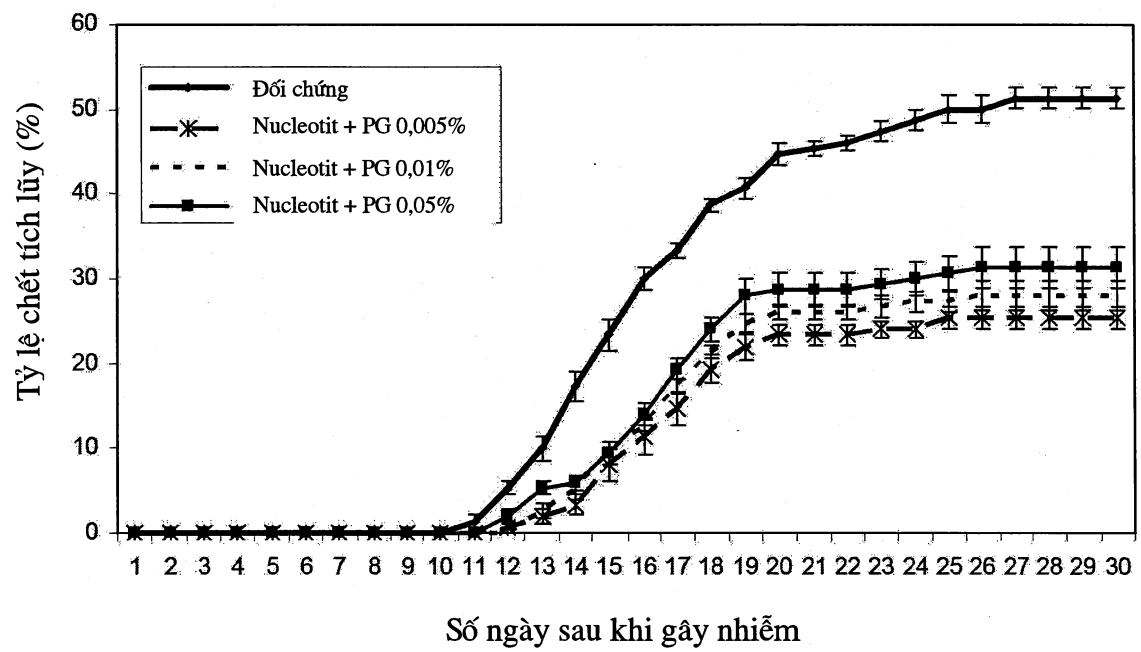
Cần phải hiểu rằng các dấu hiệu của sáng chế nêu trên có thể được cải biến mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thức ăn cho cá chứa các thành phần thức ăn thông thường, trong đó chế phẩm thức ăn này chứa peptidoglycan và nucleotit, trong đó peptidoglycan có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,001-0,01%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,001-0,005%, tốt nhất là 0,005% khối lượng.
2. Chế phẩm thức ăn theo điểm 1, trong đó nucleotit có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,05% -1% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1-0,5% khối lượng, tốt nhất là 0,2% khối lượng.
3. Chế phẩm thức ăn theo điểm 1, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 4, tốt hơn là lớn hơn 20, và tốt hơn nữa là lớn hơn 40, và lượng peptidoglycan nằm trong khoảng từ 0,001-0,01% khối lượng của chế phẩm thức ăn.
4. Chế phẩm thức ăn theo điểm 1, trong đó lượng nucleotit là vào khoảng 0,2% và lượng peptidoglycan là khoảng 0,005% tổng khối lượng của chế phẩm thức ăn này.
5. Chế phẩm thức ăn chứa các thành phần thức ăn thông thường, nucleotit, và peptidoglycan dùng để phòng và/hoặc điều trị các bệnh lây nhiễm ở cá, và/hoặc dùng để làm giảm các triệu chứng của bệnh lây nhiễm, trong đó lượng peptidoglycan nằm trong khoảng từ 0,001-0,01%.
6. Chế phẩm thức ăn theo điểm 5, trong đó peptidoglycan có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,001-0,005% và tốt hơn là với lượng 0,005% khối lượng.
7. Chế phẩm thức ăn theo điểm 5, trong đó chế phẩm này được cấp cho cá trong thời gian trước khi cá chịu tác động của tác nhân nhiễm bệnh, trong khi bị nhiễm bệnh hoặc sau khi bị nhiễm bệnh.
8. Chế phẩm thức ăn theo điểm 5, trong đó tỷ lệ khối lượng giữa nucleotit và peptidoglycan là lớn hơn 4, tốt hơn nữa là lớn hơn 20, và tốt hơn nữa là lớn hơn 40.

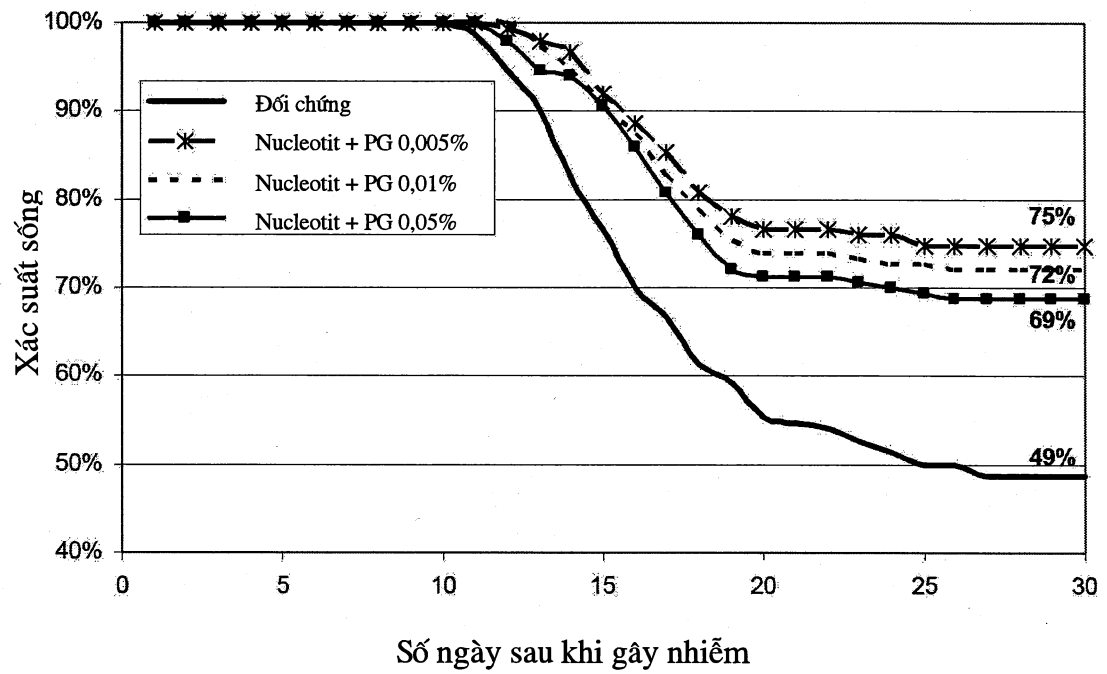
9. Chế phẩm thức ăn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 8, trong đó chế phẩm này được sử dụng làm chế phẩm thức ăn chức năng để phòng hoặc làm giảm các triệu chứng liên quan đến bệnh lây nhiễm ở cá.
10. Chế phẩm thức ăn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 9, trong đó chế phẩm này được sử dụng để làm tăng tỷ lệ sống và/hoặc tốc độ phát triển ở cá chịu tác động của tác nhân nhiễm bệnh.
11. Chế phẩm thức ăn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10, trong đó sự nhiễm bệnh do vi khuẩn như *Piscirickettsia salmonis*, *Moritella viscosa*, *Francisella* sp. gây ra, bệnh viêm miệng, nhiễm khuẩn liên cầu, vi khuẩn phẩy; bệnh tuyến tụy, NSAV, viêm mang (GI), viêm tim và cơ xương (HSMI), do virus hoại huyết cá hồi (ISA), nấm thủy mi và rận biển gây ra.
12. Chế phẩm thức ăn theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 11, trong đó cá là thuộc họ cá hồi, tốt hơn là cá hồi Đại Tây Dương.
13. Chế phẩm thức ăn theo điểm 5, trong đó chế phẩm này được sử dụng để phục hồi hữu hiệu sau khi nhiễm bệnh và/hoặc sau quá trình dùng chất kháng sinh để trị nhiễm bệnh và/hoặc làm giảm nguy cơ tái nhiễm bệnh.

1/4



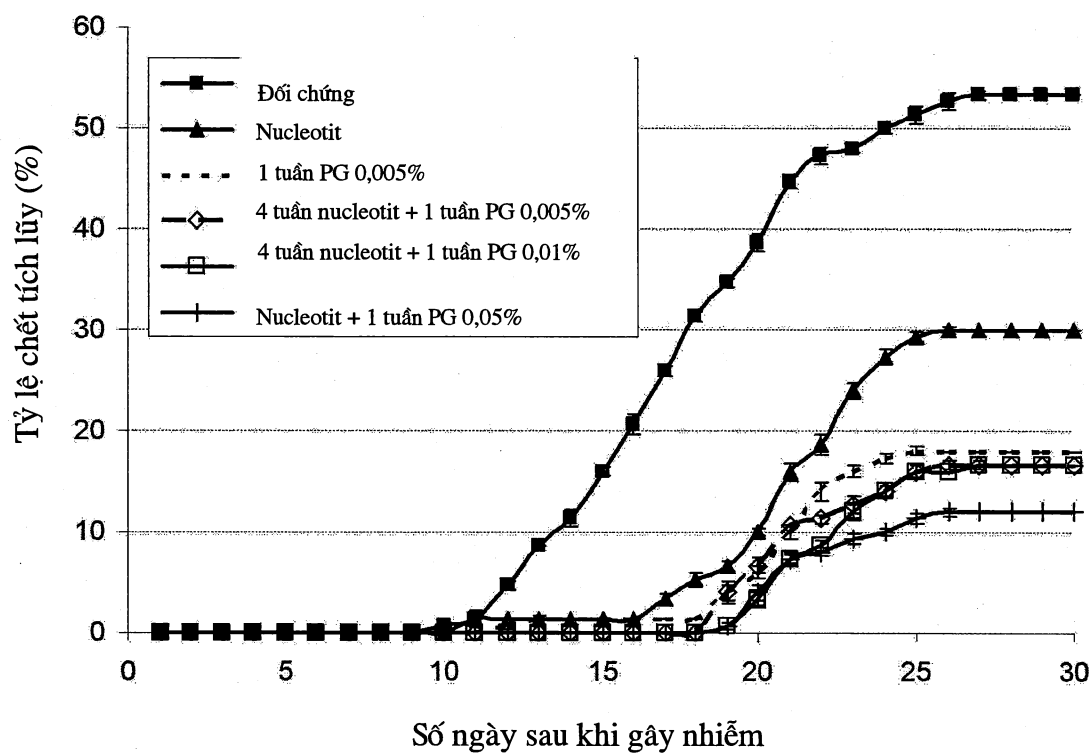
Hình 1

2/4



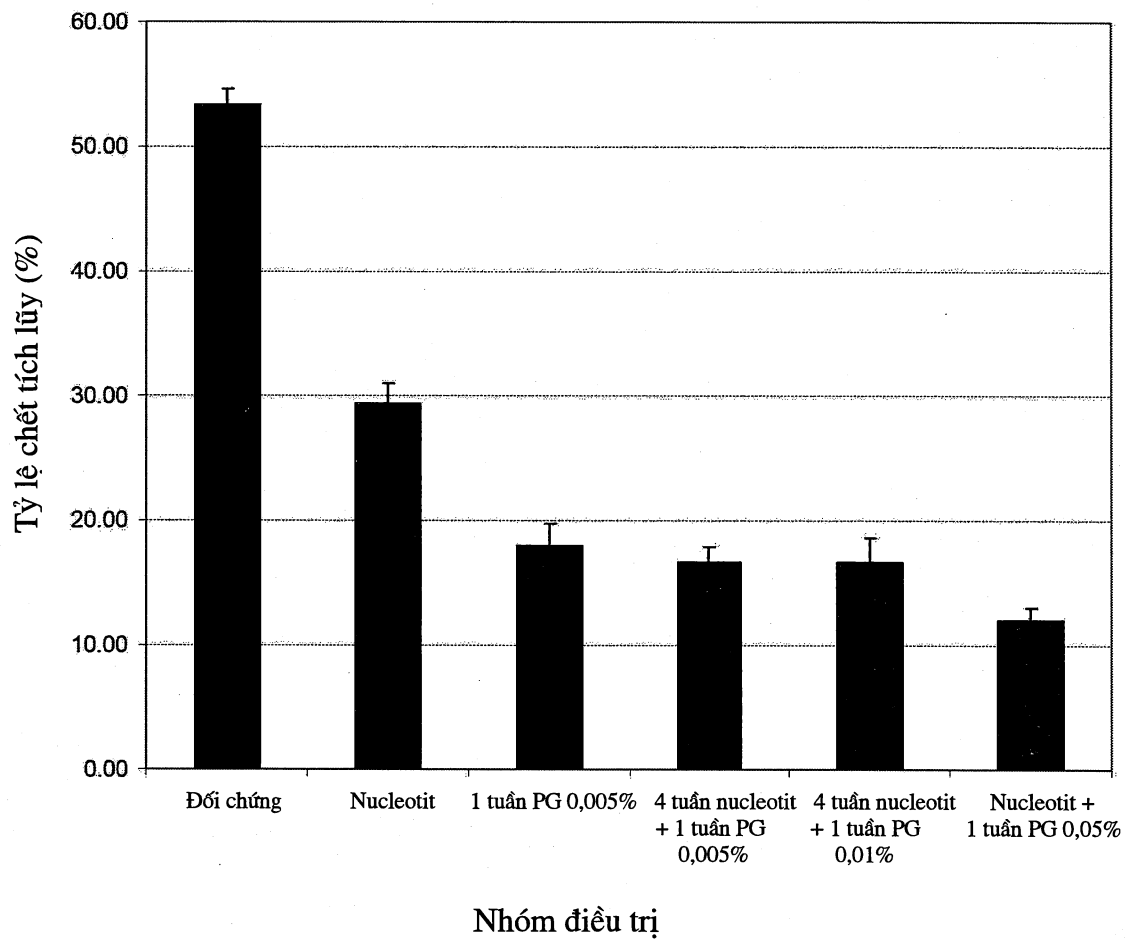
Hình 2

3/4



Hình 3

4/4



Hình 4