



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106999460 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 09

(21) 申请号 201580056189.9	(73) 专利权人 信息化学和应用神经研究所
(22) 申请日 2015.08.07	地址 法国圣萨蒂南-达普特
(65) 同一申请的已公布的文献号	(72) 发明人 帕特里克·帕格特
申请公布号 CN 106999460 A	(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300
(43) 申请公布日 2017.08.01	代理人 汤国华
(30) 优先权数据	(51) Int.Cl.
62/036,436 2014.08.12 US	A61K 31/201 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61P 33/00 (2006.01)
2017.04.12	A61P 33/14 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	审查员 陈沛
PCT/IB2015/001887 2015.08.07	
(87) PCT国际申请的公布数据	
W02016/024168 EN 2016.02.18	

权利要求书1页 说明书29页 附图9页

(54) 发明名称

用于抑制海虱附着于鱼上的棕榈油酸

(57) 摘要

本发明描述了一种化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物,和/或它们的混合物。本发明还描述了治疗海虱的方法,该方法包括对有这种治疗需要的鱼施予化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含抑制海虱附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物,和/或它们的混合物。

1. 合成棕榈油酸、其盐和/或反式-9-十六烯酸以及可接受的赋形剂在制备用于抑制海虱桡足幼体附着于鱼的组合物中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述组合物包含0.1ppm~10ppm的合成棕榈油酸、其盐和/或反式-9-十六烯酸以及可接受的赋形剂。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述组合物包含0.6ppm~6ppm的合成棕榈油酸、其盐和/或反式-9-十六烯酸以及可接受的赋形剂。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中,可接受的赋形剂是药学上可接受的赋形剂或兽医可接受的赋形剂。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述组合物可以呈粉末、片剂、丸剂、胶囊、粒状、粒状颗粒、干片的形式,呈缓释制剂的形式,置于胶束、脂质体、纳米颗粒、微粒中,被微胶囊化或冻干。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述组合物为溶液形式。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中,所述溶液被配制成放在水下扩散器中或在缓释基质中的喷雾剂、气溶胶、乳液、悬浮液、滴剂。

8. 根据权利要求6所述的用途,其中,所述溶液可以添加至鱼驻留的水中、或者放置在鱼食中。

9. 根据权利要求6所述的用途,其中,所述溶液通过口服或注射施予鱼。

用于抑制海虱附着于鱼上的棕榈油酸

技术领域

[0001] 本发明涉及包含抑制海虱桡足幼体 (copepodites) 附着的化学信息素和可接受的赋形剂的化学信息素组合物, 该抑制海虱桡足幼虫附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物, 和/或它们的混合物。此外, 本发明还涉及治疗海虱的方法, 该方法包括对有这种治疗需要的鱼施予化学信息素组合物, 该化学信息素组合物包含抑制海虱附着的化学信息素和可接受的赋形剂, 该抑制海虱附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物, 和/或它们的混合物。

背景技术

[0002] 海虱被认为是造成渔业生产中的卫生和经济损失的最重要的原因之一 (Johnson 等人, 2004)。在大西洋鲑鱼 (Atlantic salmon/*Salmo salar*) 和虹鳟鱼 (rainbow trout/*Oncorhynchus mykiss*) 中, 鲑疮痂鱼虱 (*Lepeophtheirus salmonis*) 和其它鱼虱桡足幼体 (caligid copepodids) 被视为鲑科鱼 (salmonid fish) 养殖发展的主要障碍, 这导致只要没有令人满意的处理方法, 当局就会限制新养殖场的建立 (Stewart 等人, 2004)。

[0003] 目前似乎作为最常见且最重要的物种的鲑疮痂鱼虱 (*Lepeophtheirus salmonis*) 显示出包括截然不同的生命阶段的复杂生命周期。其中, 桡足幼体阶段是特别令人感兴趣, 这是因为这是侵染时期 (Pike 和 Wadsworth, 1999)。作为第一幼体期 (无节幼体 I 和无节幼体 II), 桡足幼体 (copepodite) 不具有功能性消化道, 而是使用由它的脂肪组织的分解代谢而获得的能量。它的寿命似乎限于 2 个星期, 在此期间它必须通过触角钩来附着在宿主上。桡足幼体作为最多的浮游生物, 即使它们具有显示出一定速度的运动的能力 (这使得它们可以捕获宿主并附着在其上), 它们也随着河流被动移动。文献报导道, 通过响应于线性水加速度 ($3 \pm 12\text{Hz}$ 的频率, 其持续 1 ± 3 秒) 的爆发式游泳 (burst swimming) 来促进与宿主的接触 (Heuch & Karlsen, 1997)。这种行为可能源自于在自由放养的桡足幼体中观察到的避免捕食者的策略 (Heuch & Karlsen, 1997)。鱼鳍上首次侵染的高频率可以被认为是支持以下假说的另一论点: 桡足幼体被它们周围所产生的小规模水运动所激活 (Tully 等人, 1993a)。一些作者 (Anon, 1993) 已经提出, 可能存在一个重要的通过鳃腔, 附着幼体 (chalimus) 在变态之后向体表迁移的被动侵染。最近的研究表明, 这个理论可能由实验性侵染期间的人为因素造成。在关于自然大规模侵染的报导中的低频率的腮侵染应当被认为是反对这一假说的有力论据 (Tully 等人, 1993b 和 2002)。

[0004] 在钩在鱼上之后, 桡足幼体似乎使用了化学感应信息。已经描述了触角的化学受体, 这可以解释附着在不合适的宿主 (非鲑科鱼) 上的桡足幼体的离开及返回河流 (Bron, 1993)。

[0005] 不同的研究已经描述了化学信息素在疮痂鱼虱属 (*Lepeophtheirus*) 的侵染行为中的作用。在使得可以鉴定一些化学成分的任何研究之前, 不同的观察强调了化学信息参与的可能性。桡足幼体的触角携带感官捕捉器, 并且它还负责钩在鱼上 (Bon, 1993)。如前所述, 当桡足类附着在非鲑科鱼上时, 它们倾向于脱钩, 并且出现这种区别似乎很可能是由于

化学信息。通过鱼皮释放的化学信号的存在并不令人感到惊讶,这是因为已经证明皮肤粘液包括各种脂类化合物,众所周知其参与各种物种之间的化学通信 (Lewis,1970)。

[0006] 但是,最重要的文献的获得是由于“鱼类调理水 (fish conditioned water)”的吸引效应的证据,所述“鱼类调理水”是通过鱼已经在其中进行游泳的水进行取样而获得的 (Ingvarsdóttir等人,2002;Bailey&Mordue,2003;Pino-Marambio等人,2007&2008)。已经识别出了一些确切的化合物,并且在它们之间,异佛尔酮和1-辛烯-3-醇看起来似乎被触角选择性地检测到。令人遗憾地,已经获得的关于成年海虱的大部分已发表的数据并不针对寄生物的侵染生命周期。

[0007] 一些其它的数据表明,应激影响鲑科鱼 (salmonids) 面对海虱侵染的攻击的脆弱性 (Tully等人,1993a&b;MacKinnon,1998;Mustafa&MacKinnon,1999)。这种应激可能涉及各种刺激,在这些刺激中,银化 (smoltification) (Barton等人,1985) 和社会应激 (social stress) 在无法被视为真正驯化的物种中似乎是至关重要的 (Sloman等人,2001;Gilmour等人,2005)。血浆皮质醇的升高可能通过降低皮肤粘液中的抗体的浓度 (特别是IgM免疫球蛋白的浓度) 来起作用 (Magnadóttir,1998;Hou等人,1999)。这些抗体看起来似乎在抗侵染的免疫中发挥作用,其可能影响附着幼体所携带的毛的附着 (Tully等人,2002)。

[0008] 鱼类养殖已导致鱼从农场中逃脱,并融入野鲑鱼种群。这对野生鱼类种群的疾病传播和食物竞争具有影响。相比野生鱼,养殖鱼具有很多改变的特征。一个这样的特征在于,养殖鱼比它们的野生鱼更具侵略性 (Johnson&Abrahams,1991)。另一特征在于,养殖鱼的后代的生长快于野生鱼 (Fleming等人2000)。由于鱼类养殖,鲑鱼虱的宿主的数目已成倍增加。

[0009] 存在两种海虱,即疮痂鱼虱属 (鲑疮痂鱼虱 (*Lepeophtheirus salmonis*)) 和鱼虱属 (*Caligus elongatus*)。可以通过它们的褐色马蹄形壳体来识别它们。它们稳固地附着于鱼类上,并且通过食用鱼鳞 (scale)、细胞组织、血液和粘膜来损伤它们。鱼的免疫系统被削弱,导致继发感染和鱼类死亡的可能性。具有大于10~15只鲑鱼虱的鲑鱼幼鲑 (smolts) 是病弱的,并且在返回河流进行产卵之前不大可能从其在海中的旅居中幸存。海虱的低非致死性侵染可以引起鱼类的应激反应,导致盐分不平衡、免疫力下降和感染增加 (Tully等人,2002)。通常,12~15只海虱可以杀死一条野生鲑鱼。

[0010] 鲑鱼虱有基本的治疗方法,一种是生物学方法和另一种是化学方法。使用隆头鱼 (其为隆头鱼科 (family Labridae) (鲈形目 (order Perciformes)) 的海洋鱼类),可以摘取和吃掉外寄生虫鲑鱼虱,这是一种生物学方法。出于该目的,在水产养殖业中使用梳隆头鱼 (goldsinny wrasse)、梳隆头鱼属 (*Ctenolabrus*)、巴兰隆头鱼 (ballan wrasse)、贝氏隆头鱼 (*Labrus bergylta* Ascanius)、锯隆头鱼 (corkwing wrasse)、娇扁隆头鱼 (*Symphodus meliops* (L.))、rock cook鱼、小口棘隆头鱼 (*Centrolabrus exoletus* (L.))、布谷隆头鱼 (cuckoo wrasse)、双斑隆头鱼 (*Labrus bimaculatus* L) 和帕氏刺隆头鱼 (scale-rayed wrasse) (帕氏刺隆头鱼 (*Acantholabrus palloni*))。

[0011] 化学方法涉及灭虱浴或者在鱼饲料中使用药粒的使用。针对鲑鱼虱使用的浴治疗包括:有机磷酸酯比如敌敌畏、敌百虫和甲基吡啶磷;拟除虫菊酯比如氯氰菊酯和溴氰菊酯;除虫菊提取物和过氧化氢。饲料治疗包括阿维菌素比如甲氨基阿维菌素苯甲酸盐、二氟脲、氟苯脲 (teflubenzuron)、氯氰菊酯、顺式-氯氰菊酯和伊佛霉素。通常,SLICE (甲氨基阿

维菌素苯甲酸盐)的添加持续8个星期。

[0012] 然而,随着时间对浴疗和鱼饲料治疗的耐药性变得明显,这导致的低效治疗、对非目标生物的毒性,对鱼是有应激的并且是昂贵的。在许多情况下,需要治疗的休药期(withdrawal period),并且经常会发生再次侵染,特别是在养殖鲑鱼中,其中定期的寄生虫治疗对耐药性发展施加了持续的压力。

[0013] US专利7,879,809记载了使用多杀菌素或者生理上可接受的衍生物或者其盐控制在水产养殖鱼中的体外寄生物侵染。多杀菌素已知是广谱的有机杀虫剂。

[0014] US专利6,982,285记载了一种具有活性成分1-[4-氯-3-(3-氯-5-三氟甲基-2-吡啶基氧基)苯基]-3-(2,6-二氟苯甲酰基)脲的注射溶液来控制鱼寄生物。

[0015] 尽管药物和化学品用于治疗鱼寄生物比如海虱为本领域已知,但是它们经常对环境不利。耐药性在多数情况下发生,从而导致在鲑鱼和其它养殖鱼类中缺乏治疗效果和死亡率升高。因此,需要解决海虱侵染的其它方案。

[0016] 化学信息素是由植物或动物发出的可以在另一生物体中引起行为或生理学应答的化学物质。当化学信息素影响相同物种的个体时,它被称作信息素(pheromone)。当化学信息素影响不同物种的个体时,它被称为异种化感物(allelochemical)。

[0017] 参与种间通讯的那些化学物质信号被归为异种化感物信号的一般范畴。异种化感物信号通常被分成两个亚组,并且它们的功能影响信号释放者和消息接受者之间的关系。当存在发出的化学物质信号涉及有利于释放者,则该亚组被称为异源外激素(allomone;利己素)。根据该定义,异源外激素(allomone)是由一种物种产生的激素或者物质,其可以对另一物种产生影响,特别是有益于释放物种的影响。例如,通过特定花释放的诱人的异源外激素可以吸引可以给这些花授粉的各种昆虫。

[0018] 相反地,当所释放的化学物质信号涉及有利于接受者时,则该亚组被称为种间激素(kairomone;利它素)。根据定义,种间激素是可以吸引其它物种、有时甚至是天敌的信息素或者物质。种间激素有时与寄生物对特定宿主的定位有关联。例如,通过人皮肤释放的乳酸就是一种针对许多蚊科(Culicidae)的已知的种间激素。异源外激素和种间激素是天然物质,其降解不会对最终使用者造成伤害。这些化学物质也不会引起免疫并且是安全的。

[0019] 因此,本领域中需要提供一种对环境友好的组合物和方法以用于抑制海虱附着于鱼上,其可以易于施予并且是有效的,而不会伤害鱼类或对鱼类产生应激或者影响水环境。

[0020] 如发明内容、优选实施方案的描述和权利要求所证实的,本发明实现了上述需要和其它目的。

发明内容

[0021] 本发明涉及一种化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、其衍生物、其异构体和/或其结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物(其驱使海虱离开鱼)。

[0022] 另一方面,本发明还涉及一种化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素、以及无毒的填料和/或增强剂组合物和可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含0.1ppm~约10ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生

物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0023] 另一方面,本发明还涉及一种化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含0.6ppm~约6ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0024] 本文中所述的可接受的赋形剂是药学上可接受的赋形剂或兽医可接受的赋形剂。

[0025] 如本文所述,包含合成棕榈油酸的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物可以进一步包含无毒的填料或增强剂组合物。无毒的填料选自下组:脂肪酸、醇、胺、角鲨烯、甘油及它们的混合物,而增强剂组合物含有来自吡啶衍生物的胺和脂肪酸、这些胺和脂肪酸的酯、酮、丙酮、醇或者甾醇。

[0026] 另一方面,本文中所述的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物是合成棕榈油酸的酯、醇、酮、酰胺、醚、醛或甾醇衍生物、其盐、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或混合物,以及可接受的赋形剂。

[0027] 化学信息素组合物可以呈以下形式:粉末、片剂、丸剂、胶囊、粒状(granulated)、粒状颗粒(granular particle)、干片(dry flake)或者其它适于使用的形式。它还可以呈缓释制剂的形式:置于胶束、脂质体、纳米颗粒、微粒中或者被微胶囊化。化学信息素组合物还可以被冻干。

[0028] 本发明的另一方面是含有包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素的组合物的溶液,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、异构体和/或结构类似物(其保持它们的化学信息素能力),和/或混合物。该溶液可以用可接受的赋形剂比如药学上可接受的赋形剂或药学上可接受的赋形剂进行配制。该溶液还可以包含如本文所述的无毒的填料、或者如本文所述的增强剂组合物。

[0029] 本发明的另一方面是该溶液包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物包含约0.1ppm~约10ppm的合成棕榈油酸、其盐、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力)和/或混合物。该溶液可以用可接受的赋形剂比如药学上可接受的赋形剂或兽医可接受的赋形剂进行配制。该溶液还可以包含如本文所述的无毒的填料、或者如本文所述的增强剂组合物。

[0030] 本发明的另一方面是该溶液包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物包含约0.6ppm~约6ppm的合成棕榈油酸、其盐、异构体和/或结构类似物(其保持它们的化学信息素能力),和/或混合物。该溶液可以用可接受的赋形剂比如药学上可接受的赋形剂或兽医可接受的赋形剂进行配制。该溶液还可以包含如本文所述的无毒的填料、或者如本文所述的增强剂组合物。

[0031] 溶液可以呈喷雾剂、气溶胶、乳液、悬浮液、滴剂的形式,可以被放置在水下扩散器中或在缓释基质中。它可以被添加至鱼驻留的水中,或者被放置在鱼食中。还可以将它通过口服或注射施予鱼。

[0032] 本发明的另一方面是一种驱使海虱离开鱼的方法,所述方法包括对鱼施予包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂的化学信息素组合物,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保

持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0033] 本发明的另一方面是一种驱使海虱离开鱼的方法,所述方法包括对鱼施予包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂的化学信息素组合物,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含0.1ppm~10ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),以及它们的混合物。

[0034] 本发明的另一方面是一种驱使海虱离开鱼的方法,所述方法包括对鱼施予包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂的化学信息素组合物,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含0.6ppm~6ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),以及它们的混合物。

[0035] 本发明的另一方面是用于抑制海虱附着于鱼上的化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),以及它们的混合物,以及可接受的赋形剂。

[0036] 本发明的另一方面是用于抑制海虱附着于鱼上的化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含约0.1ppm~约10ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),以及它们的混合物,以及可接受的赋形剂。

[0037] 本发明的另一方面是用于抑制海虱附着于鱼上的化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含约0.6ppm~约6ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),以及它们的混合物,以及可接受的赋形剂。

附图说明

[0038] 图1是海虱在幼年鲑鱼上的照片。

[0039] 图2是显示Smiley Chamber试验设置的示意图,其是改编自常规嗅觉仪的试验。

[0040] 图3是原始Smiley Chamber试验的照片。

[0041] 图4是实验中所使用的嗅觉仪(olfactory)的照片。

[0042] 图5是在过滤嗅觉仪的流出液体之后计数的桡足幼体的照片。

[0043] 图6是侵染试验开始时的照片。幼鲑放置在水箱中,在水箱中,它们将被饲养在3ppm的包含合成棕榈油酸的化学信息素产品或安慰剂(placebo)中。

[0044] 图7是显示通过使用金属勺子摩擦鱼以除去所有可能附着在鱼上的桡足幼体而收获的桡足幼体的照片。

[0045] 图8是显示实施例6中对照鲑鱼和对照鳕鱼相比经处理鲑鱼的结果的箱形图。

[0046] 图9是显示实施例6的对照组中的桡足幼体的数目的图表。

[0047] 图10是显示实施例6的经处理鲑鱼组中的桡足幼体的数目的图表。

[0048] 图11是显示实施例6的对照鳕鱼组中的桡足幼体的数目的图表。

具体实施方式

[0049] 优选的实施方案的描述

[0050] 本文中使用的“鱼”包括以下中的任一成员:脊索动物门(Phylum Chordata)脊椎动物亚门(Sub Phylum Vertebrate)和无颌总纲(Superclasses Agnatha)、软骨鱼纲(Chondrichthyes)和硬骨鱼纲(Osteichthyes),纲:辐鳍亚纲(Actinopterygii),目:鲑形

目 (Salmoniformes) 或鲈形目 (Perciformes) 或鲇形目 (Siluriformes)。例如但不限于,以下鱼类物种可以如本发明涵盖所提及:鲶鱼、鲤鱼、鳟鱼、鲑鱼、海鲈鱼 (sea bass)、海鲷、白鱼 (whitefish)、红点鲑 (char)、茴鱼 (grayling) 和鲈鱼。

[0051] 本发明所涵盖的鲶鱼中,包括沟鲶 (channel catfish)、蓝鲶鱼 (blue catfish)、扁头鲶 (flathead catfish)、黄鲶鱼 (yellow catfish) 等。鲤鱼包括火鲤 (common carp)、银鲤、草鲤等。鳟鱼包括:绿背切喉鳟鱼 (Green Back Cutthroat trout)、Rio Grand切喉鳟、蛇河切喉鳟、斑鳟、溪鳟 (Brook trout)、Hybrid Cut-Bow鳟鱼、虹鳟、Palomino虹鳟等。鲑鱼包括奇努克鲑 (Chinook salmon)、银鲑 (Coho salmon)、红鲑 (Sockeye salmon)、狗鲑 (Chum salmon)、粉鲑 (Pink salmon)、大西洋鲑、钢头鲑 (Steelhead salmon) 等。海鲈 (sea bass) 包括Bank海鲈、智利海鲈 (Chilean sea bass)、黑海鲈 (Black sea bass)、岩石海鲈 (Rock sea bass)、斑点海鲈 (spotted sea bass) 等。海鲷包括黑海鲷、金头海鲷和红海鲷 (Red sea bream)。白鱼包括通常的白鱼、湖白鱼 (lake whitefish)、大西洋白鱼、柱白鱼 (round whitefish)、山白鱼、北鲑 (Inconnu)、太平洋白鱼、里海白鱼、石颌鲷 (white steenbras) 等。红点鲑包括花羔 (Dolly Varden) 红点鲑、大西洋红点鲑、Wisconsin象牙红点鲑等。茴鱼包括欧洲茴鱼、北极茴鱼等。鲈鱼包括:攀鲈、欧洲鲈鱼 (European perch)、巴尔喀什鲈鱼 (Balkhash perch)、黄鲈 (Yellow perch)、金鲈 (Golden perch)、银鲈 (Silver perch)、河鲈 (spangled perch)、白鲈 (White perch) 等。

[0052] “鱼的应激”是指导致释放与应激相关的激素或导致特定的生理学应答的身体、化学或精神不适。应激引起身体反应比如心率、血压增加、血糖升高、皮质醇水平释放。它包含皮质醇水平升高至超过100ng/ml。增高的皮质醇水平可以导致鲑科鱼的心肌重构 (Johansen等人, The Journal of Experimental Biology (2011) 214, 1313-1321)。在鱼类中存在不同类型的应激,其包括囚禁应激 (confinement stress)、处理应激 (handling stress)、分选应激 (sorting stress)、分级应激 (grading stress) 和运输应激 (transportation stress)。应激可能有助于降低鱼的抵抗力,从而导致疾病的扩散和寄生物侵染。它还对鱼类的摄食行为、成长和竞争能力具有影响 (Gregory等人, Physiological and Biochemical Zoology (1999) 72 (3):286-295)。

[0053] 本文所述的“水产养殖”是指在受控条件下培育鱼类的科学、技术和商业。

[0054] “活性成分”是指赋予其作为抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素的治疗特性的分子,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物 (其保持它们的化学信息素能力),以及它们的混合物。

[0055] 本说明书中使用的术语“海虱”包括管口目 (Siphonostomatoida) 鱼虱科 (Caligidae) 中的任何桡足类 (copepod),其包括疮痂鱼虱属 (Lepeophtheirus) 和鱼虱属 (Caligus)。其例子包括:鲑疮痂鱼虱 (Lepeophtheirus salmonis)、Lepeophtheirus pectoralis、Lepeophtheirus thompsoni、Lepeophtheirus europaensis、伸长鱼虱 (Caligus elongatus)、Caligus orientalis、Caligus teres、智利鱼虱 (Caligus rogercresseyi)、Caligus punctatus、Caligus epidemicus、海虱 (Caligus clemensi) 等。海虱在不同的水中被发现。因此,例如鲑疮痂鱼虱影响在北半球的更冷水域的大西洋鲑。它还侵染日本鲑科鱼 (salmonids in Japan)。C.orientalis还在日本虹鳟中被发现。C.elongatus是英国水域中最普遍的物种,C.teres和C.rogercresseyi是智利水域中最普

遍的物种, *C.epidemicus*、*C.punctatus*和*C.orientalis*是亚洲水域中最普遍的物种, *L.pectoralis*出现在东北大西洋、波罗的海和白海, *C.elongatus*出现在南半球 (特别是在澳大利亚)。

[0056] 本说明书中使用的“桡足幼体”是指任意的各种各样非常小的桡足类亚纲 (subclass Copepoda) 的甲壳纲动物, 其具有细长的身体和分叉的尾巴。与大部分甲壳纲动物不同, 桡足类 (copepods) 缺少背部的甲壳, 并且不具有复眼。盐水和淡水中的桡足类都很丰富, 并且是许多水生动物的重要食物来源。桡足类包括水蚤。

[0057] 本文中使用的术语“cop”是“桡足幼体 (copepodite)”的缩写。

[0058] 本说明书中使用的“化学信息素”是指, 由植物或动物发出的能够在另一生物体中引起行为或生理学应答的化学物质。当化学信息素影响相同物种的个体时, 它被称作信息素。当化学信息素影响不同物种的个体时, 它被称为异种化感物。

[0059] “异源外激素”是指, 通过一种生物体产生的化学信息素, 其可以引诱在另一物种的生物体中的响应。它产生对释放者有利的响应。例如, 一些植物产生了驱除昆虫并阻止它们进食的异源外激素。

[0060] 本文中使用的“种间激素 (kairomone)”是, 通过一种物种的生物体释放的、有益于或者影响另一物种的生物体的化学物质信使 (messenger)。种间激素的一个例子是吸引或者驱除动物的花香。

[0061] 本说明书中使用的“棕榈油酸”包括顺式-9-十六烯酸, 并且分子式为 $C_{16}H_{30}O_2$ 。棕榈油酸 (Palmitoleic acid) 还被称为鲨油酸 (zoomaric acid)、棕榈亚油酸 (palmitolinoleic acid)、(9Z)-十六烯酸、(Z)-十六-9-烯酸、(9Z)-十六-9-烯酸、顺式- δ (9)-十六烯酸, 16:1n-7或者16:1^{A9}。

[0062] “合成的”是指棕榈油酸是化学上或酶法制备的, 而不是从自然界中分离的。

[0063] 本文中使用的“衍生物”包括合成棕榈油酸的酯、醇、酮、酰胺、醚、醛、和甾醇、它们的衍生物、它们的盐、它们的异构体和/或它们的结构类似物, 和/或它们的混合物。这些合成棕榈油酸衍生物可以代替如本文所述的组合物中的一种或多种化学信息素, 并且具有相同的效果。

[0064] 脂肪酸的衍生物可以通过本领域已知的方法合成。例如通过酸催化剂催化的、脂肪酸与醇的直接酯化产生脂肪酸酯和水。通过氢化, 脂肪醛可以转变为脂肪醇。脂肪酸酰胺可以如下制备: 在无水条件下, 使脂肪酸的酯和低级醇与氨或者单或二烷基甲基或乙基胺反应, 然后将低级醇从反应中除去。

[0065] “异构体”包括结构异构和立体异构。结构异构体 (structural isomer) 为具有相同的构成原子但彼此排列不同的异构体。结构异构体的例子为丙醇和异丙醇。空间异构体在分子上包含以相同方式连结的相同的原子, 并且彼此仅在原子或原子组的空间排列上不同。空间异构体的例子为葡萄糖 (glucose) 和右旋糖 (dextrose)。棕榈油酸异构体的例子包括: 11-顺式-十六烯酸和9-顺式、12-顺式十六烷酸, 以及反式-9-十六烯酸。

[0066] “结构类似物”是指在结构上彼此相似、但是在特定成分上彼此不同的一组化合物。结构类似物可以在一个以上原子、官能团或子结构 (其被子结构的其它原子、官能团所取代) 上存在差异。其例子包括: 2-甲氧基-5-十六烯酸、卤代棕榈油酸比如 ω -氟代棕榈油酸、硝化棕榈油酸、氯化棕榈油酸、 ω -羟基壬烯二酸等。

[0067] 本说明书中使用的术语“混合物”包括合成棕榈油酸以及其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物,其保持抑制海虱附着于鱼上的活性。例如,混合物可以包括合成棕榈油酸和合成棕榈油酸的异构体,或者它们可以包括合成棕榈油酸的结构类似物和合成棕榈油酸的衍生物。

[0068] 术语“溶液”是指固体或油通过溶解或悬浮而分散在液体中的液体。

[0069] “可接受的赋形剂”是指任何药学上可接受的赋形剂或者兽医赋形剂,它不会干扰抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物活性(该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物包含合成棕榈油酸、其盐、异构体和/或结构类似物,和/或混合物),并且对其所施予的鱼无毒。

[0070] “增强剂组合物”是指活性组合物,其在鱼中是物种特异性的,并且其可用于增强如本文中所述的基本化学信息素组合物或者与如本文中所述的基本化学信息素组合物协同地起作用,以增强如本文所述的基本化学信息素组合物在鱼中的有效性。

[0071] “施予(administering)”是指,将如本文中所述的包含合成棕榈油酸的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物施用于鱼的水环境、或者将如本文中所述的包含合成棕榈油酸的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物施用于鱼饵用以摄食、或者将如本文所述的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物直接施用在鱼上或施用于鱼内。因此,本发明也预期到对鱼口服、注射、局部施予以及将化学信息素组合物置于鱼的环境。

[0072] “环境”是指鱼周围环境。

[0073] “基本上由……组成”是指,抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物具有合成棕榈油酸的活性成分,但可以包括其它不会影响所述活性成分的化学信息素特性的化合物。

[0074] 本发明涉及包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂的化学信息素组合物,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或混合物。

[0075] 如本文中所述,化学信息素组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含约0.1ppm~约10ppm、或者约0.6ppm~约6ppm之间、或者约1ppm~约5ppm之间、或者约0.05ppm~约20ppm之间的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0076] 另一方面,本发明还涉及化学信息素组合物,该化学信息素组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和无毒的填料或增强剂组合物、以及可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含约0.1ppm~约10ppm之间、或者约0.6ppm~约6ppm之间、或者约1ppm~约5ppm之间、或者约0.05ppm~约20ppm之间的合成棕榈油酸的盐、合成棕榈油酸的衍生物、合成棕榈油酸的异构体和/或合成棕榈油酸的结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0077] 另一方面,本发明还涉及组合物,该组合物包含抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素包含约0.6ppm~约6ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0078] 可接受的赋形剂是药学上可接受的赋形剂或兽医可接受的赋形剂。它包括溶剂、分散体介质、吸收延迟剂等。这些药学上可接受的赋形剂如Remington的Pharmaceutical Sciences第21版(2005)中所述。可接受的赋形剂可以例如是乙二醇醚或者生理盐水。可接受的赋形剂将随配制化学信息素组合物的方式而变化。它可以在制剂期间被添加入抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物中,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物包含合成棕榈油酸、或其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0079] 本文所述的化学信息素组合物的药学上可接受的盐包括为合成棕榈油酸的有机盐或无机盐的那些物质。这些是已知的,并且描述在医师桌面参考手册(Physician's Desk Reference)、默克索引和古德曼+吉尔曼治疗学的药理学基础中。药学上可接受的盐例如为与无机酸(比如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸等)形成的、或者与有机酸(比如草酸、富马酸、酒石酸、丙二酸、醋酸、柠檬酸、安息香酸等)的钠、钾、铵、钙和镁盐。

[0080] 本文中所述的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物可以进一步包含无毒的填料或者增强剂组合物。无毒的填料选自下组:脂肪酸、醇、胺、角鲨烯、甘油及它们的混合物,而增强剂组合物含有:来自吡啶衍生物的胺和脂肪酸、这些胺和脂肪酸的酯、酮、丙酮、醇或者甾醇。

[0081] 另一方面,本文中所述的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物是合成棕榈油酸的酯、醇、酮、酰胺、醚、醛或甾醇衍生物、其盐、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0082] 本文中所述的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物可以配制在化学载体上,前提条件是:保持合成棕榈油酸、其盐、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物的生物活性结构。这种载体分子包括冠状化合物比如冠醚、脂质体、纳米颗粒、微粒和载体蛋白。

[0083] 可以将任何种类的脂质体用于诱陷本文中所公开的化学信息素组合物。可以使用任何天然或合成的磷脂比如磷酸甘油酯和鞘脂来制作脂质体。可以使用天然磷脂,比如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰丝氨酸。可使用的合成磷脂包括二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺。根据应用,可以将胆固醇混入脂质体中。可以在1:1或者甚至2:1的胆固醇对PC的摩尔比之间变化的浓度,混入胆固醇。

[0084] 脂质体可以是单层囊泡(unilamellar vesicles)或者多层囊泡(multilamellar vesicles)。脂质体还可以交联。

[0085] 本发明的脂质体可以通过本领域已知的方法,使用被动加载技术或主动加载技术进行制备。机械分散法的例子包括脂质膜水合方法、微乳液法、超声处理、法压法(French press method)、薄膜挤压法、干燥重构脂质体法(dried reconstituted vesicle method)、冻融脂质体法。溶剂分散方法包括乙醇注射、醚注射、双乳液囊泡、反相蒸发囊泡和稳定的复层囊泡(stable plurilamellar vesicles)。对于脂质体制备,还可以使用去污剂比如胆酸盐和曲通X[®]100和通过透析、稀释或柱层析来除去去污剂。

[0086] 此外,还可以使用纳米颗粒来递送如本文所述的化学信息素组合物。这些颗粒的尺寸小于或等于100nm。它们可以由以下材料进行制作:天然材料或衍生物、树枝状聚合物

(dendrimer)、富勒烯、聚合物、二氧化硅、清蛋白、金、水凝胶和本领域已知的其它材料。用于制造纳米颗粒的天然材料的例子包括壳聚糖、葡聚糖、明胶、藻酸盐和淀粉。可被用于本发明的纳米颗粒中的各种聚合物包括聚乳酸、聚(氰基)丙烯酸酯、聚乙烯胺、嵌段共聚物、聚己酸内酯和聚(乳酸共乙醇酸)(PLGA)。

[0087] 纳米颗粒可以涂有各种材料,比如葡聚糖涂层、肠溶包衣、聚合物涂层、金涂层、聚乙二醇(PEG)涂层和碳水化合物涂层。

[0088] 纳米颗粒可以使用不同的方法进行制备,比如研磨、热解(pyrolysis)、使用热等离子体法、气相技术、多重乳液-溶剂蒸发法、气流聚焦、电喷射、流体纳米沉淀法、乳液扩散-蒸发法、改性相转化/溶剂扩散法、或者溶胶-凝胶法。这些方法描述在文献中,并且为本领域技术人员所公知。

[0089] 微粒是尺寸在0.1~100 μ m之间的颗粒。它们可以使用与纳米颗粒的材料类似的材料,由天然聚合物或合成聚合物制作。因此,以下是一些用来制备微粒的材料:纤维素、淀粉、溶血磷脂酰胆碱、聚(乳酸)、磷酸胆碱、聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)、藻酸盐-精胺、聚氨基酸、聚磷腈、清蛋白、葡聚糖、Eudragit S 100、Eudragit L100、明胶和3-(三乙氧基甲硅烷基)丙基-封端的聚二甲硅氧烷。本发明的微粒还可以与其它材料接枝。作为例子,使用聚甲基丙烯酸甲酯或聚丙烯酸酯接枝的淀粉微粒、或者有机硅接枝的淀粉微粒。

[0090] 此外,还可以使用与上述针对纳米颗粒所述的那些材料相同的涂料来涂覆微粒:即葡聚糖涂层、肠溶包衣、聚合物涂层、金涂层、Eudragit S 100涂层、PEG涂层和碳水化合物涂层。

[0091] 在配制微粒中,可以使用若干方法,比如喷雾-干燥、乳液/蒸发、双重乳液/蒸发、盐析、溶剂置换/沉淀、低温制备(cryopreparation)和油包油乳液/溶剂蒸发。这些以及其它方法描述在以下文献中(例如参见Kendall等人,Eur.J.Pharm.,Sci 37,284-290(2009)),并且为本领域已知。

[0092] 如本文中所述的化学信息素组合物可以呈以下形式:粉末、片剂、丸剂、胶囊、粒状、粒状颗粒、干片或者其它适于使用的形式。此外,它还可以呈置于胶束中或者被微胶囊化的缓释制剂形式。化学信息素组合物还可以被冻干。

[0093] 在一个实施方式中,如本文中所述的化学信息素组合物使用本领域已知的聚合物的化学配方(比如Eudragit、乙基纤维素、微晶纤维素、滑石和硬脂酸镁),被配制成无毒的在水中可分散的片剂。将聚合物与化学信息素组合物进行混合,然后使用压片机进行压缩。片剂的尺寸可以根据要处理的面积大小和鱼的数量而变化。

[0094] 可以被添加入配方中的另外的载体包括:葡萄糖、乳糖、甘露糖、阿拉伯树胶、明胶、甘露糖醇、淀粉糊、三硅酸镁、滑石、玉米淀粉、角蛋白、胶体二氧化硅、马铃薯淀粉、脲、短链脂肪酸、中等链长甘油三酯、葡聚糖、低聚果糖(oligofructans)和适用于制备制剂的其它载体,其呈固体、半固体或者液体形式。此外,可以使用辅助的稳定剂、增稠剂或着色剂,例如作为稳定剂和干燥剂,比如丙酮糖(triulose)。

[0095] 本文中所述的化学信息素组合物可以在如下所述的各种溶液中稀释,并且可以各种液体形式使用。

[0096] 本发明的另一方面是含有抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物的溶液,该抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素组合物包含合成棕榈油酸、或其盐、衍生物、异构体

和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0097] 另一方面,含有抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素组合物、和无毒的填料或增强剂组合物的溶液形成了本发明的一部分,该抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素组合物包含合成棕榈油酸、或其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0098] 溶液可以包含约0.1ppm~约10ppm之间、或约0.6ppm~约6ppm之间、或约1ppm~约5ppm之间、或约0.05ppm~约20ppm之间的合成棕榈油酸或其盐、衍生物、异构体、和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。可以将无毒的填料或增强剂组合物添加入所述溶液中。

[0099] 另一方面,一种包含抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素的溶液,包含约0.6ppm~约6ppm的合成棕榈油酸或其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0100] 通过将溶剂添加入合成棕榈油酸或其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持它们的化学信息素能力),和/或它们的混合物溶液中,可以制作溶液。溶剂的例子包括碱性溶液、乙醇(ethyl alcohol)、乙醇(ethanol)、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、生理盐水等。

[0101] 溶液可以呈喷雾剂、气溶胶、水下扩散器、缓释基质的形式,可注射,并且呈滴剂形式。可以将它添加入水中作为浴,或者将它放置在鱼食中,或者可以将它施用于鱼,或者将它注入鱼内。因此,本发明包括口服治疗、局部治疗和可注射治疗。此外,本发明还包括将如本文中所述的化学信息素组合物放置在鱼环境中。

[0102] 可以将鱼引诱剂比如乳酪、玉米粒、盐虾、龙虾(crawfish)等添加入如本文所述的组合物或溶液中。

[0103] 本发明的另一方面是驱使海虱离开鱼的方法,所述方法包括对鱼施予化学信息素组合物或化学信息素溶液,该化学信息素组合物或化学信息素溶液包含抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0104] 本发明的另一方面是驱使海虱离开鱼的方法,所述方法包括对鱼施予化学信息素组合物或化学信息素溶液,该化学信息素组合物或化学信息素溶液包含抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素和无毒的填料或增强剂组合物、以及可接受的赋形剂,该抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素包含合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0105] 本发明的另一方面是驱使海虱离开鱼的方法,所述方法包括对鱼施予化学信息素组合物或化学信息素溶液,该化学信息素组合物或化学信息素溶液包含抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素和可接受的赋形剂,该抑制海虱挠足幼体附着的化学信息素包含约0.1ppm~约10ppm、或约0.6ppm~约6ppm、或约1ppm~约5ppm、或约0.05ppm~约20ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。此外,还可以将无毒的填料或增强剂组合物添加入该组合物中。

[0106] 在这种方法中,化学信息素组合物或化学信息素溶液被施予45分钟~2小时、或10分钟~5小时、或20分钟~3小时。时间段取决于如本文中所述的化学信息素组合物或如本文中所述的化学信息素溶液如何配制。

[0107] 本发明的另一方面是用于抑制海虱附着于鱼上的如本文中所述的化学信息素组合物或如本文中所述的化学信息素溶液。

[0108] 该化学信息素组合物或化学信息素溶液,用于抑制海虱附着于鱼上,其中,所述化学信息素组合物或化学信息素溶液包含约0.1ppm~约10ppm、或约0.6ppm~约6ppm、或约1ppm~约5ppm、或约0.05ppm~约20ppm的合成棕榈油酸、其盐、衍生物、异构体和/或结构类似物(其保持驱使海虱离开鱼的化学信息素能力),和/或它们的混合物。

[0109] 本文中所述的化学信息素组合物和溶液包含脂肪酸。脂肪酸以固体形式可从各种公司中购得。此外,它们还可以通过本领域已知的方法化学合成或酶法合成。然而,由于其难以溶解脂肪酸,因而通常在恒定搅拌下,并且在约37℃~约38℃之间(更优选约38℃)的温度下,将脂肪酸添加入溶剂中。

[0110] 一旦获得,可以测试本发明的组合物抑制海虱的功效。

[0111] 现在,将通过以下实施例的描述来说明本发明,毫无疑问地,其实质上并不是为了限制本发明。进一步地,本发明的特征将从以下观察中变得更清楚,毫无疑问地,这仅仅是为了说明本发明的范围而不是以任何方式限制本发明的范围。

[0112] 实施例

[0113] 实施例1-推定的化学信息素的化学鉴定

[0114] 对60条鲑科鱼(salmonid fish)(36条鲑鱼(salmon)和24条虹鳟)进行采样,用于局部解剖粘液和血液分析。出于同样的目的,将12条鲑鱼的互补的种群(complementary population)用于全身粘液采样,而将属于鳕科的12条非鲑科鱼也进行采样。鳕科种群(population)包含以下属(genus)和种(species):

[0115] -大西洋真鳕(*Gadus morhua*):5条鱼

[0116] -绿青鳕(*Pollachius virens*):10条鱼

[0117] -青鳕(*Pollachius pollachius*):2条鱼

[0118] -黑线鳕(*Melanogrammus aeglefinus*):1条鱼

[0119] 对所有样品(包括血样和血涂片)进行化学分析。对血样分析蛋白、皮质醇血浆水平和挥发性化合物,而对血涂片分析异嗜性细胞/淋巴细胞比值(heterophiles to lymphocytes ratio,HLR)和白细胞。将一半的粘液样品保持在-18℃下用于免疫评估和蛋白鉴定,而将另一半用于挥发性化合物的鉴定。

[0120] 根据May-Grünwald-Giemsa方法对血涂片进行染色,用于白血细胞计数,然后计算异嗜性细胞/淋巴细胞比值(HLR)。基本上,这个方法包括:将血涂片固定在甲醇中15分钟,使用May-Grunwald进行染色5分钟,在Giemsa中进行染色10分钟,在pH=6.8下的缓冲液中进行冲洗,在丙酮中脱水两次,在二甲苯中洗净三次,对白细胞、异嗜性细胞和淋巴细胞数到合计60个细胞。

[0121] 使用来自Enzo®生命科学的酶联免疫吸附(ELISA)检测,对血样进行测试,以评估皮质醇血浆水平。

[0122] 首先,通过使用用于选择性水溶性或脂溶性的不同的溶剂比如二氯甲烷,提取挥

发性化合物。利用GC-GC/MS法,分析这种提取液。对色谱图和它们的变异进一步进行分析。

[0123] 到目前为止被考虑的唯一指标是皮质醇的血浆浓度。测量值与文献中公布的值相当。尽管如此,还是获得了一些异常数值,特别是从鲑鱼(salmon)中。

[0124] 在鲑鱼(salmon)中,携带海虱的鱼相比于没有寄生物的那些鱼,在它们之间没有显著差异。两组显示出大约100,000pg/ml的高浓度血浆皮质醇,但两组样品是从采样前刚宰杀的鱼中获得的。相反地,在虹鳟中,相比于非侵染鱼(61,408.75pg/ml),侵染鱼类具有较高的血浆皮质醇浓度(78,490.55pg/ml)。

[0125] 鲑鱼(salmon)中不存在差异可能与在血液采样之前宰杀鱼有关。

[0126] 血液样品和粘液样品使用二氯甲烷进行提取,然后使用使它们经过由Perkin Elmer公司制造的涡轮质谱仪进行气相色谱/质谱(GC/MS)。在180℃下,使用(EI+)以70eV的能量轰击实现探测。使用长度为30m的JW柱型DB5(id=0.25mm;25μm的薄膜;以1/20的分流以及45秒的分流/不分流)。

[0127] 为了确认从GC/MS分析中获得的特定分子的结构,进行甲烷中的正化学电离(CI+),以可视化分子峰(分子质量)。该方法为本领域已知。

[0128] 使用数据库分析结果,以获得最可能图谱。具有这种数据的数据库是本领域中公知的。

[0129] 对五种可能令人感兴趣的化学信息素进行鉴定。这些化学信息素如下所述。

[0130] 来自青鳉属(Pollachius)的推定的异源外激素(PASA:青鳉属抗海虱异源外激素)

[0131] 该分泌物由青鳉(pollock)(绿青鳉(Pollachius virens))获得。它是挥发性化合物的缔合,其不存在于鲑科鱼(salmonid)中。该分泌物是令人感兴趣的,这是由于这些鱼的种群似乎大量存在于其中养殖有鲑科鱼(salmonid)的箱子中。此外,尽管这些野生鱼消耗鲑鱼的食物(它们中的大多数在捕获之后回吐三文鱼颗粒),并且早已经存在于食物中和鲑科鱼(salmonid)皮肤粘液中的挥发性化合物存在于它们的皮肤粘液中,但是这些鱼未遭受海虱攻击。

[0132] 来自健康的鲑科鱼(salmonid)的推定的异源外激素(HRSA1和HRSA2:健康稳定的鲑科鱼异源外激素(Healthy Resistant Salmonid Allomone)1和健康稳定的鲑科鱼异源外激素2)

[0133] 在非侵染的鲑鱼和虹鳟的皮肤粘液中,发现了挥发性化合物的缔合,其可以来帮助桡足幼体避免定殖于具有有效免疫系统的鱼类中。而且,通过将化合物的该缔合与非侵染鲑鱼或鳟鱼(它们与侵染鱼生活在一起)的分析进行比较,可以将化合物的该缔合细分为两个亚组:HRSA1和HRSA2。

[0134] 来自侵染鲑科鱼的推定的种间激素(VSSK:易危鲑科鱼海虱种间激素(Vulnerable Salmonid Sealice Kairomon))

[0135] 在被侵染的鲑鱼和虹鳟的皮肤粘液中,发现了挥发性化合物的缔合,其可以通过帮助桡足幼体选择免疫系统受损且使得它们易受寄生物攻击的鱼。该分泌物必须与在携带海虱的鱼中增加的另一化学模式区分开来。

[0136] 推定的海虱引诱信息素(LHSP:疮痂鱼虱属宿主信号信息素(Lepeophtheirus Host Signalling Phero))

[0137] 该分泌物可以通过虱子(在虱子在宿主上发育之后)释放,或者该分泌物可以是由

海虱诱发的、来自鱼的分泌物。

[0138] 对于所有下述筛选试验,溶液已被盲法(blinded),并将针对推定的异源外激素的溶液定为A、B、D、E、F,将针对推定的种间激素的溶液定为M、N、P、Q、R、S。在下述实施例中,对这些溶液进行描述。

[0139] 实施例2-推定的化学信息素的筛选

[0140] 在评估推定的化学信息素的效果中,采用Smiley Chamber试验(图2和图3)。这是改编自日常嗅觉仪的试验。

[0141] 将针对各新型化学信息素的一组四个600ml的烧杯和四个2m的长管进行分隔。使用流动着的温淡水将Smiley Chamber和桡足幼体圆柱进行洗涤30秒,使用去污剂进行30秒(任温淡水流动),让温淡水流动另一30秒,清空隔间(chamber)并且将2-丙醇喷洒在隔间中并集中在管支架上和有机硅上,再次让温淡水流动30秒,然后让来自水分配器的冷水流动,最后添加海水。视需要,可以重复进行这个清洗流程若干次。

[0142] 然后,用300~500ml的海水填充三个烧杯。剩余的烧杯用6ppm的化学信息素进行填充。Smiley Chamber用300ml的海水进行填充,或者用正好足以覆盖管的量的海水填充。将泵速设为20RPM(5.49ml/min)。针对管子,在隔间的对照侧和测试侧上以及烧杯上进行同样的设置。

[0143] 将桡足幼体圆柱放置在两个出口管中间,然后通过手在圆柱上施加压力的同时,将桡足幼体倒入圆柱中,从而开始实验。进行核查,以确保桡足幼体没有逃离圆柱。将泡沫聚苯乙烯墙放置在Smiley Chamber周围,然后打开置于该隔间之上的两盏灯。然后,打开泵,开始计时。在38秒之后,含有30%棕榈油酸、20% C13十三烷醛和50%油醇的物质A、以及含有50%棕榈油酸和50%角鲨烯的物质B开始进入隔间。在3分30秒之后,将带有桡足幼体的圆柱缓慢地直线升高,将相机放置在该盖子上。在T0、T3min、T6min、T9min和T10min下拍照。在结束实验10分钟之后,关掉泵。将照相机、盖子和泡沫聚苯乙烯墙移除,然后观察对照侧和测试侧之间的活性的差异的视觉印象,以及视觉上的桡足幼体的粗略计数。对数据进行分析,以观察起反应桡足幼体是否向一个方向移动。

[0144] 使用染色剂观察试验显示:在6分钟之后,从一侧到另一侧存在反流(reflux),从而导致两个通道的混合。出于这个原因,评估的主参数是T6min下的图片。

[0145] 根据实验方案,对推定的异源外激素与调理水竞争进行测试。该调理水由与鲑鱼粘液进行混合的海水构成。为避免伤害鱼类或者被任何血液污染样品,粘液通过以下方法获得:将500g的鲑鱼放置在一次性使用塑料袋中15秒。粘液粘附于塑料袋壁上,然后将该粘液与600ml的海水进行混合。在用于测试前,将该调理水存储在+4℃下。

[0146] 检验三种推定的种间激素(E含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的角鲨烯,Q含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的棕榈酸,以及R含有30%的月桂酸、30%的棕榈酸和40%的油酸)和2种推定的异源外激素(A含有30%的棕榈油酸、20%的C13十三烷醛和50%的油醇,以及B含有50%的棕榈油酸和50%的角鲨烯)。使用调理水的试验被用来鉴定试验所需的合适浓度。

[0147] 在3种检测种间激素的情况下,含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的角鲨烯的E是最有效的化合物,其显示出非常明显的引诱效果并且在桡足幼体中引起明显的躁动。考虑到参照引诱剂异佛尔酮用作对照,含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的角鲨烯

的E溶液显示出非常相当的功效。含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的棕榈酸的Q虽然具有多功能,但是却不具有可比的效果。

[0148] 含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%角鲨烯的E,由易危鲑鱼获得的推定种间激素似乎是令人感兴趣的种间激素,其功效必须在进一步试验中确认。

[0149] 如上所述的代码E对应于推定的种间激素群VCCMIS (来自侵染鲑科鱼的皮肤粘液的挥发性化合物)。

[0150] 在被侵染的笼里生活的非侵染鲑鱼和鳟鱼的分泌物中识别出的异源外激素A (含有30%的棕榈油酸、20%的C13十三烷醛和50%的油醇) 和异源外激素B (含有50%的棕榈油酸和50%的角鲨烯),测试它们与调理水的竞争。在4次重复实验中,B未显示出任何可见的效果。相反地,如上所述的A却显示数一些令人感兴趣的效果。进行10次重复实验,其中仅5次提供有用的数据。A似乎抑制了调理水的引诱效果。如上所述,A属于推定的异源外激素HRSR的群 (由健康稳定的鲑科鱼释放的)。

[0151] 实施例3-通过线型嗅觉仪筛选

[0152] 本试验的目的是为了获得更确切的结果,在桡足幼体计数上具有更高的精密度。由于桡足幼体似乎运动性有限,因而使用被划分为3个区室的小设备将嗅觉仪简化 (图4)。该系统首先对携带化学信息素的那些通道 (一个通道,其具有使用乙醇作为溶剂的参照物;一个通道,其具有测试混合物) 的对称性进行验证。实验方案中的另一改善是对计数法的改进,以确保在嗅觉仪中被引入的且在各自区室中被统计的桡足幼体的数量被准确计数。

[0153] 为了计数桡足幼体,它们首先被从饲养箱中捞出,然后被划分成滴剂,并且放置在ELISA型塑料板的孔中。立体显微镜被用来计数桡足幼体,因此桡足幼体的确切数量已知并且被输入嗅觉仪。线型嗅觉仪被划分为3个内部区室:左分支和右分支、以及中心区域,加上外部流出区域 (其中,桡足幼体被收集在培养皿中,并过滤以计数桡足幼体)。

[0154] 30只桡足幼体幼虫被加入嗅觉仪的主分支中,其中,它们面对在8℃~12℃的温度下的恒定流量 (0.84ml/s)。该液流被划分成2个子液流,各自来自250mL的瓶子。从一个子液流中,桡足幼体仅接收试验产物的溶剂 (乙醇),从另一个子液流中,桡足幼体接收浓度为10ppm的推定的化学信息素混合物。试验进行十 (10) 分钟。在该时间段后,停止液流,将手术镊施用于嗅觉仪上的管上,以阻断包含于4个区域中的水。通过立体显微镜检查该水,以计数桡足幼体 (图5)。

[0155] 检验3种推定的异源外激素混合物 (A、B、D) 和4种推定的种间激素 (E、Q、R、S)。异源外激素混合物包含以下组合物:

[0156] A: 含有30%的棕榈油酸、20%的C13十三烷醛和50%的油醇。

[0157] B: 含有50%的棕榈油酸和50%的角鲨烯。

[0158] D: 含有60%的油醇和40%的角鲨烯。

[0159] 种间激素混合物包含以下组合物:

[0160] E: 含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的角鲨烯。

[0161] Q: 含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的棕榈酸。

[0162] R: 含有30%的月桂酸、30%的棕榈酸和40%的油酸。

[0163] S: 含有40%的月桂酸、40%的肉豆蔻酸和20%油酸。

[0164] 结果如以下表1~6所示。通过威尔科克森符号秩 (Wilcoxon signed rank) 计算统

计分析。

[0165] 表1-异源外激素A

[0166]

A	复制物	处理分支	安慰剂分支	主分支	废弃物
	1	0	1	19	10
	2	1	2	14	13
	3	0	4	23	3
	4	0	2	12	16
	5	0	3	7	20
	6	6	0	8	16
	7	0	1	4	25
	8	0	3	11	16
	9	0	4	6	20
	10	0	3	15	12
	平均值	0.7	2.3	11.9	15.1
	中位数	0	2.5	11.5	16
	标准差	1.888562063	1.33749351	6.00832755	6.10009107
检验 经处理的~安慰剂 p=0.084					

[0167] 在没有来自编号6的数据的情况下,重新计算数据,如下表2所述。

[0168] 表2-异源外激素A(无#6)

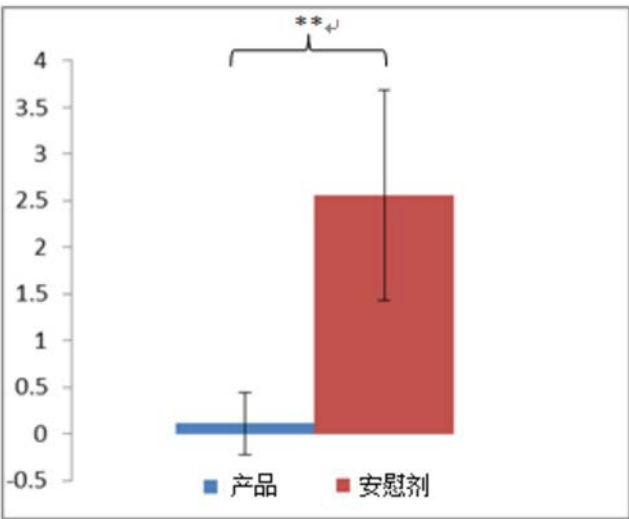
[0169]	A (无 #6)	复制物	处理分支	安慰剂分支	主分支	废弃物
		1	0	1	19	10
		2	1	2	14	13
		3	0	4	23	3
		4	0	2	12	16
		5	0	3	7	20
		7	0	1	4	25
		8	0	3	11	16
		9	0	4	6	20
		10	0	3	15	12
		平均值	0.111111111	2.555555556	12.3333333	15
		中位数	0	3	12	16
		标准差	0.333333333	1.130388331	6.20483682	6.46142399

[0170] 下图显示:由于异源外激素A,桡足幼体的平均数量在安慰剂分支中显著高于在处理分支中。

[0171]

检验
经处理的~安慰剂
 $p=0.0039^{**}$

挠足幼体的平均数量
在安慰剂分支中显著
高于在处理分支中



[0172] 表3- 种间激素E

[0173]

E	复制物	处理分支	安慰剂分支	主分支	废弃物
	1	1	2	22	5
	2	7	0	12	11
	3	1	9	16	4
	4	3	3	23	1
	5	2	5	12	11
	6	1	1	23	5
	7	2	5	12	11
	8	6	4	13	7
	平均值	2.875	3.625	16.625	6.875
	中位数	2	3.5	14.5	6
	标准差	2.356601669	2.825268635	5.1806646	3.79614466

检验
经处理的~安慰剂
 $p=0.563$

[0174] 表4- 种间激素Q

[0175]

Q	复制物	处理分支	安慰剂分支	主分支	废弃物
	1	5	0	10	15
	2	1	1	21	7
	3	0	4	16	10
	4	5	2	14	9
	5	1	1	22	6
	6	2	0	19	9
	平均值	2.333333333	1.333333333	17	9.33333333
	中位数	1.5	1	17.5	9
	标准差	2.160246899	1.505545305	4.5607017	3.14112506

检验
经处理的~安慰剂
 $p=0.625$

[0176] 表5- 种间激素R

[0177]

复制物	处理分支	安慰剂分支	主分支	废弃物
1	2	2	20	6
2	2	2	22	4
3	1	1	22	6
4	0	3	16	11
5	0	0	22	8
6	3	3	12	12
平均值	1.333333333	1.833333333	19	7.833333333
中位数	1.5	2	21	7
标准差	1.211060142	1.169045194	4.14728827	3.12516666

检验
 经处理的~安慰剂
 $p=1$

[0178] 表6-种间激素S

[0179]

复制物	处理分支	安慰剂分支	主分支	废弃物
1	3	4	11	12
2	5	0	11	14
3	0	6	13	11
4	7	0	8	15
5	4	1	16	9
6	1	2	22	5
7	0	2	14	14
8	0	0	19	11
9	1	1	24	4
10	5	0	15	10
平均值	2.6	1.6	15.3	10.5
中位数	2	1	14.5	11
标准差	2.547329757	2.011080417	5.07827617	3.68932394

检验
 经处理的~安慰剂
 $p=0.516$

[0180] 在该检验中所使用的所有混合物之间,提供的真正令人感兴趣结果的唯一一个是A。该溶液可以被视为推定的异源外激素混合物。相反地,使用E的检验导致了一些互相矛盾的结果、产物(没有提供显著的引诱效果)。与之前检验的矛盾可能是由于在Smiley Chamber系统中缺乏精度而导致的后果。

[0181] 实施例4:评价侵染测试中的推定的化学信息素

[0182] 考虑到先前测试的结果,注意力集中在推定的化学信息素A、B、E、F和P,其在前述实施例1~3中所述的测试中被积极地选择或者未进行测试。基于这些结果,将试图识别出导致桡足幼体脱离的特定信号。

[0183] 以下是化学信息素A、B、E、F和P中所述的化合物:

[0184] A: 含有30%的棕榈油酸、20%的C13十三烷醛和50%的油醇。

[0185] B: 含有50%的棕榈油酸和50%的角鲨烯。

[0186] E: 含有30%的棕榈油酸、30%的油酸和40%的角鲨烯。

[0187] F: 含有50%的角鲨烯、30%的C13十三烷醛和30%的油酸。

[0188] P: 含有17%的肉豆蔻酸、17%的棕榈酸、56%的棕榈油酸和10%的油酸。

[0189] 在检验装置(其包括四个23cm直径的箱槽,该箱槽具有流出口(outflow))中,该检验使幼年鲑鱼(重量差不多70克的幼鲑(smolt))暴露于高密度组的桡足幼体中45分钟。该检验装置用帐篷状物进行保护,其不允许在鱼周围有任何阴影或不受控制的光。光线可以改变具有向光性的桡足幼体的行为。各箱槽接纳幼鲑45min(图6)。

[0190] 首先,将桡足幼体从它们的饲育箱槽中捞出,并在立体显微镜上进行计数。制备四种侵染剂量的桡足幼体(其各含有60只桡足幼体),用于各检验的运行。将幼鲑们放置在含有处理溶液(或者安慰剂)的箱槽中,其活性物质中的浓度为6ppm。该浴持续了10分钟。

[0191] 然后,将幼鲑们放置在箱槽(其中,幼鲑们被保持在3ppm与先前的水浴中所使用的相同的处理(产品或安慰剂))中,以开始检验。该工艺的目的在于防止它们皮肤上的活性制品的浓度的任何显著降低。

[0192] 在第一段10分钟期间,打开流出口,关闭帐篷状物。在那时,再次填充各箱槽,以达到充氧液体的初始体积(使用相同的溶液、制品或安慰剂进行再次填充)。然后,将流出口关闭5分钟,在箱槽中加入侵染剂量。然后,打开流出口,并且保持打开状态30分钟,在每10分钟再次填充(未打开帐篷状物)。

[0193] 在暴露于桡足幼体45分钟之后,以10倍于一般剂量(30~40mg/L)的浓度,施予中毒剂量的麻醉剂Benzoak®,对幼鲑进行安乐死。

[0194] 将死亡的鱼放置在塑料袋中,在塑料袋中,用海水对它们进行擦拭和冲洗。如图7所示地,用金属勺子来刮擦鱼的皮肤,以除去所有可能附着在鱼上的桡足幼体。

[0195] 对各鱼进行清洗,从而使所有的桡足幼体和贝类从鱼皮中脱离。将从清洗液中收集的液体进行过滤,以统计寄生物。在滤器上统计桡足幼体,以获知鱼外部身体上的桡足幼体的数量。然后,将鳃进行解剖,以统计在鳃上的桡足幼体的数目。

[0196] 检验的第一阶段是在检验的复制品之间,对身体上和鳃上的桡足幼体的数目进行比较。这个阶段的目的是在于验证检验,并且测量它的标准差。

[0197] 检验的第二阶段是在经处理幼鲑和参照幼鲑之间,对身体上和鳃上的桡足幼体(下表中简称为cop)的数目进行比较,作为对照,参照幼鲑仅被浸浴于海水加乙醇的五种溶液中。结果如下表所示。

[0198] 表7-参照(Reference)/对照(Control)

[0199]	复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
	1	21	1
	2	21	1
	3	18	5
	4	18	2
	5	23	3
	6	18	1
	7	18	5
	8	24	2
	9	21	5
	10	30	5
	平均值	21.2	3.0
	标准差	3.8	1.8

[0200] 表8-化学信息素A

复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
1	21	0
2	15	2
3	17	2
4	15	1
5	12	4
6	18	1
7	22	1
平均值	17.1	1.6
标准差	3.5	1.3

[0202] 表9-化学信息素B

复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
1	23	3
2	24	1
3	17	0
4	25	3
5	25	1
6	13	7
平均值	21.2	2.5
标准差	5.0	2.5

[0204] 表10-化学信息素E

复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
1	25	3
2	17	1
3	18	5
4	15	4
5	5	2
6	22	2
7	7	6
8	15	1
平均值	15.5	3.0
标准差	6.8	1.9

[0206] 表11-化学信息素F

复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
1	23	4
2	30	4
3	15	4
4	25	4
平均值	23.3	4.0
标准差	6.2	0.0

[0208] 表12-化学信息素P

[0209]

复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
1	23	6
2	21	6
3	21	5
4	21	5
平均值	21.5	5.5
标准差	1.0	0.6

[0210] 该检验的再现性似乎非常有趣,其中,鱼身上的桡足幼体的数量似乎是恒定。根据文献(Tully等人,2002),在该检验中,这种侵染低且极有可能涉及非常高浓度的桡足幼体。

[0211] 这些数据并未对任意的检验溶液产生任何显著影响。观察由如上所述的A所获得的结果,它表明:相比于先前的检验,该溶液在该检验中并未显示出相同的效果。如上所述的A不能够抑制桡足幼体附着在幼鲑上。尽管缺乏意义,但是相比于参照或者相比于其他推定的异源外激素,使用如上所述的A处理的在幼鲑上的身体桡足幼体的数目不知何故较低。令人感兴趣地,所有那些推定混合物包含一种通用的化合物,棕榈油酸。

[0212] 实施例5-使用棕榈油酸重复实施例4

[0213] 使用棕榈油酸,重复与实施例4中相同的检验。结果如下表13所示。

[0214] 表13-棕榈油酸

[0215]

复制物	身上的桡足幼体	鳃上的桡足幼体
1	6	0
2	11	3
3	7	5
4	8	3
平均值	8.0	2.8
标准差	2.2	2.1

[0216] 棕榈油酸提供重要的侵染降低。

[0217] 相比于Bron等人(1993)和Tully等人(2002)的数据,该测试提出了通过这样的实验侵染所揭示的可能“身体侵染(body infestation)”的问题。桡足幼体受到突然加速的影响而倾向于附着于移动主体上(Heuch和Karlsen,1997)。在该实施例中,高密度桡足幼体的种群连续围绕鱼周围。有理由怀疑,即使存在有效的异源外激素,它也会导致桡足幼体的多次相继的附着-脱离。因此,当检验结束时,总有一些桡足幼体刚刚附着在身体上,且当在死鱼上被收获时,其没有时间脱离。这种假说揭露了任何验证可能的异源外激素产品的努力都有假阴性结果的风险。

[0218] 实施例6-验证异源外激素棕榈油酸

[0219] 确认该假说(桡足幼体在死鱼上被收获之前没有时间脱离)的最佳方法是在三个分支实验方案中进行相同的测试:两个相同的分支作为预先实验方案(参照分支和处理分支),以及包括阴性参照的新型分支,其通过下述这种鱼来进行:该物种不是疮痂鱼虱属(Lepeophtheirus)的天然宿主。

[0220] 在该实施例中,除了使用下述3组鱼之外,根据完全相同的实验方案测试合成棕榈油酸:(1)阳性参照:未经处理的小鲑鱼;(2)阴性参照:大小相当的幼年鳕鱼(大西洋真鳕(Gadus morhua));以及(3)处理组:接受棕榈油酸的小鲑鱼。

[0221] 如实施例4中所述地,进行相同的实验。结果如下表14和下表15所述。

[0222] 表14

</

[0224] 表15

附着于鳃上的桡足幼体的数量

	对照鲑鱼	经处理鲑鱼	对照鳕鱼
	0	0	2
	4	0	2
	7	0	0
	5	0	1
	1	2	0
	1	3	0
	5	5	0
	2	1	
	3	8	
	1	3	
	5	4	
	2	1	
	5	0	
	5	3	
		5	
		3	
平均值	3.285714286	2.375	0.714285714
标准-误差	2.127785827	2.334523506	0.951189731
平均值的标准误差 (S.E.M)	0.568674683	0.583630876	0.359515925
中位值	3.5	2.5	0

β 风险 (对照鲑鱼/经处理鲑鱼)	79.95%
β 风险 (对照鲑鱼/对照鳕鱼)	7.59%
β 风险 (经处理鲑鱼/对照鳕鱼)	45.57%

[0226] 箱形图结果如图8所示。对结果进行统计分析,其如图9~图11所示。进行Levenes检验,其是用来评估针对两个以上的组计算的变量的方差齐性(Equality of Variances)的推理统计。结果如下表16所示。

[0227] 表16

	Levene检验方差同质性 (Variance Homogeneity) “群体身体 (group body) ” 效果 Ddl for F : 2. 34			
	MC 效果	MC 风险	F	p
桡足幼体_身体的数量	0.254139	3.392569	0.074910	0.927979

[0229] 3组的分布呈正态(normal)。

[0230] 进行Tukey氏HSD检验,结果如下表17所示。

[0231] 表17

单元序号 (Cell N°)	Tukey HSD 检验 每个身体的桡足幼体的数量 事后检验 (Post Hoc Test) 的方法概率 (Approach Probability) 风险: MC Inter = 8.1996, dl = 34.000			
	群体-身体	1 20.786	2 6.2500	3 4.7143
1	1		0.000125	0.000125
2	2	0.000125		0.471026
3	3	0.000125	0.471026	

[0233] 这些结果显示:在对照鲑鱼和对照鳕鱼之间存在高度显著差异,在对照鲑鱼和经处理鲑鱼之间存在高度显著差异,而在经处理鲑鱼和对照鳕鱼之间不存在显著差异。

[0234] 讨论和结论:

[0235] 在实施例4~6中的“被动的身体侵染”的假说得到验证。桡足幼体附着在鳕鱼上,该鳕鱼为不是疮痂鱼虱属 (Lepeophtheirus) 的天然宿主的鱼。在鳃上的侵染也还是被动侵染,其与试验性侵染中的桡足幼体的高密度高度相关。

[0236] 异源外激素棕榈油酸诱导了附着在鲑鱼身体上的桡足幼体数量的显著降低。经合成棕榈油酸处理的鲑鱼以与鳕鱼 (是鲑疮痂鱼虱 (Lepeophtheirus salmonis) 的天然的非侵染物种) 相当的方式被侵染。

[0237] 实施例7-抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素的异构体作为鲑疮痂鱼虱 (Lepeophtheirus salmonis) 桡足幼体对大西洋鲑 (ATLANTIC SALMON/Salmo salar) 的侵染行为的抑制剂的功效

[0238] 该实施例的目的在于检验抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素 (SCAIS) 的异构体作为鲑疮痂鱼虱 (Lepoephtheirus salmonis) 桡足幼体对大西洋鲑 (Atlantic salmon/Salmon salar) 的侵染行为的抑制剂的功效。

[0239] 在该实施例中使用的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素 (SCAIS) 的该异构体是反式-9-十六烯酸。

[0240] 通过使用4轮4条鱼来实现该测试,其中8条使用反式-9-十六烯酸处理,而另外8条用作对照。针对各轮,测试4条鱼;即2条经处理鱼和2条对照。

[0241] 为了被纳入研究,幼鲑体重必须在70g~150g之间,桡足幼体必须能够主动游泳。如果幼鲑患病 (鱼鳞 (scale) 缺损、鱼鳍损伤、白内障和/或游动异常),则不在研究中使用它们。如果桡足幼体在刺激后不动,将它们从研究中剔除。

[0242] 针对各轮,将4条鱼捕获并引入至4个2-L的平底烧杯 (其中添加有1.75L的海水) 中。经处理的鱼在它们的海水中放入了6ppm的反式-9-十六烯酸,而在对照中仅使用海水。

将0.52ml的处理或对照直接注入1.75L的海水中。将4条鱼浸浴在该溶液中10分钟。

[0243] 然后,将鱼转移至另一3.5L的烧杯(其中加入了3.5L的海水),所述海水使用3ppm的反式-9-十六烯酸处理,或者是仅海水的对照。将0.52ml的处理或对照直接注入3.5L的海水中。平底烧杯配备有阀门,从而从该平底烧杯中清空0.875L。当鱼被引入烧杯中时,打开阀门。在阀门打开10分钟之后,烧杯中加入0.875L的处理的反式-9-十六烯酸或者0.875L的对照的海水。此后10分钟(在将鱼引入烧杯中之后的20分钟),关闭阀门,将以每条鱼对应60只桡足幼体(的比例)加入各平底烧杯中。5分钟后(在将鱼引入烧杯中之后25分钟),打开阀门。稍后10分钟(在将鱼引入烧杯中之后35分钟),各烧杯供应有0.875L的反式-9-十六烯酸或者0.875L的对照海水。10分钟后(在将鱼引入烧杯中之后45分钟),各烧杯中加入0.875L的反式-9-十六烯酸或者0.875L的对照海水。10分钟后(在将鱼引入烧杯中之后55分钟),各烧杯中加入有0.875L的反式-9-十六烯酸或者0.875L的对照海水。

[0244] 然后,为了用过量的麻醉产品杀死鱼,将2ml的 Benzoak[®] 注射入各平底烧杯中。然后,将鱼引入被编码的塑料袋中。在鳃室中,使用手术钳拿着鱼,并在鱼上的不同部位擦洗三次。首先在塑料袋中擦洗鱼的顶部,然后冲洗,接着在塑料袋中,擦洗鱼的底部,然后冲洗,然后在塑料袋中将整个鱼进行擦洗和冲洗。然后,将鱼从塑料袋中拿出,然后称重。然后,将塑料袋中的内容物腾空于过滤器上,然后使用放大镜,在各过滤器上统计桡足类的数目。对其他的鱼和其它轮的鱼,重复该工艺。

[0245] 表18示出了测试的鱼的轮数,以及它们是否使用反式-9-十六烯酸进行处理或者使用对照的海水进行处理。

[0246] 表18

[0247]

轮	左	中心左	中心右	右
1	SCAIS ^异	SCAIS ^异	对照	对照
2	对照	SCAIS ^异	SCAIS ^异	对照
3	对照	对照	SCAIS ^异	SCAIS ^异
4	SCAIS ^异	对照	对照	SCAIS ^异

[0248] 其中,表18中的SCAIS^异是指反式-9-十六烯酸。

[0249] 表19是由该实施例获得的结果。

[0250] 表19

[0251]

编码	处理	桡足幼体的数量	身体质量
1L	SCAIS ^异	9	94
1CL	SCAIS ^异	10	105
1CR	对照	19	122
1R	对照	20	86
2L	对照	18	97
2CL	SCAIS ^异	8	77
2CR	SCAIS ^异	4	89
2R	对照	15	92
3L	对照	20	115
3CL	对照	19	77
3CR	SCAIS ^异	16	84
3R	SCAIS ^异	16	100
4L	SCAIS ^异	9	92
4CL	对照	21	80
4CR	对照	17	101
4R	SCAIS ^异	8	84

[0252] 其中,表19中的SCAIS^异是指反式-9-十六烯酸。

[0253] 在排除标准或试验缺陷的情况下,使用储备鱼重复实验,直至获得8条经处理鱼和8条对照鱼(的结果)。如果被定性为荒谬的结果,则从数据中删除异常值(非典型值)。如果数据的中心化(centering)和减少高于绝对值3,则它被认为是异常值。在该研究中并未发现非典型数值。

[0254] 使用9.4SAS软件(2002-2012,SAS Institute公司,Cary,北卡罗来纳,美国),进行数据分析。使用SAS 9.4软件中的单变量程序,使用残差诊断图(residual diagnostics plots),对所有数据进行测试,以证明偏离正态(normality)的假设。根据正态和方差,使用在SAS94软件中的使用t test程序的Studentt检验、或者使用nparlway程序的Wilcoxon两样本检验,进行对照组和经处理组之间的比较(根据附着的桡足幼体的身体质量和数量)。使用用t test程序进行的鱼检验,来验证方差的齐性(homogeneity)。显著性阈值(significance threshold)通常设定为5%。

[0255] 表20

[0256]

处理	N Obs	变量	N	N Miss	平均值	标准差	标准误差	中位数	下 四分位数	上 四分位数
对照	8	Nb 桡								
		足幼体	8	0	18.6250000	1.9226098	0.6797452	19.0000000	17.5000000	20.0000000
		身体质量	8	0	96.2500000	16.0156174	5.6623758	94.5000000	83.0000000	108.0000000
SCAIS ^异	8	Nb 桡								
		足幼体	8	0	10.0000000	4.1057451	1.4516001	9.0000000	8.0000000	13.0000000
		身体质量	8	0	90.6250000	9.1329466	3.2289842	90.5000000	84.0000000	97.0000000

[0257] 其中,表20中的SCAI^昇是指反式-9-十六烯酸,Nb是指数量。
[0258] 进行正态检验,反式-9-十六烯酸的结果如下表21中所述。
[0259] 表21

正态试验				
检验		统计	P 值	
Shapiro-Wilk		W	0.98020 ₁	Pr < W 0.9639
[0260]	Kolmogorov-Smirnov	D	0.14089 ₅	Pr > D >0.150 ₀
Cramer-von Mises		W-Sq	0.02197 ₆	Pr > W-Sq >0.250 ₀
Anderson-Darling		A-Sq	0.15444 ₅	Pr > A-Sq >0.250 ₀

[0261] 进行正态检验,对照的结果如下表22中所述。
[0262] 表22

正态试验				
检验		统计	P 值	
Shapiro-Wilk		W	0.94572 ₅	Pr < W 0.6681
[0263]	Kolmogorov-Smirnov	D	0.13339 ₁	Pr > D >0.150 ₀
Cramer-von Mises		W-Sq	0.03006 ₈	Pr > W-Sq >0.250 ₀
Anderson-Darling		A-Sq	0.21824	Pr > A-Sq >0.250 ₀

[0264] 所有使用的检测推断出针对反式-9-十六烯酸和对照进行检验的鱼类的身体的质量的正态。
[0265] 针对方差同质性的费舍尔检验的结果如下表23所示。
[0266] 表23

方差齐性检验				
方法	Num DF	Den DF	F 值	Pr > F
Folded F	7	7	3.08	0.1615

[0268] 对于“身体质量”,处理组之间的方差是同质的。
[0269] 使用Student t检验,其结果如下表24所示。
[0270] 表24

方法	方差	DF	t 值	Pr > t
[0271] 合并	相等	14	0.86	0.4027
Satterthwaite	不相等	11.117	0.86	0.4064

[0272] 根据“身体质量”，在处理组之间鲑鱼是同质的。(p=0.4027)

[0273] 结论

[0274] 对于“身体质量”，大西洋鲑在试验组之间是同质的。“反式-9-十六烯酸 (SCAIS^异)”对附着在大西洋鲑中的桡足幼体的数目具有显著影响，而附着在经反式-9-十六烯酸 (SCAIS^异) 处理的鲑鱼中的桡足幼体的数量较低。

[0275] 实施例8-抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素片剂的制作

[0276] 含有抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素的水可分散片剂如下制作。将132g的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素与150g的Eudragit RL、200g的乙酸乙酯和110g的微晶纤维素进行共混。将25%的硬脂酸镁和5%的滑石一起共混，然后添加含有化学信息素的初始配方中。使用站旋转式压片机(station rotary tableting machine, 其具有8mm直径的平冲头)，压缩混合物。

[0277] 实施例9-抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素片剂的功效

[0278] 该实施例的目的在于评估抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素 (SCAIS, 其通过水可分散片剂连续释放) 在鲑疮痂鱼虱 (Lepeophtheirus salmonis) 桡足类幼体对大西洋鲑幼鲑 (大西洋鲑 (Salmo salar)) 的侵染行为上的功效。

[0279] 该实施例中使用的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素 (SCAIS) 为顺式-9-十六烯酸 (棕榈油酸)。

[0280] 在该研究中，使用重量大约为90g的处于幼鲑时期以及产自SALMAR[®] (Daugstad 6392 Vikebukt, 挪威) 的72条大西洋鲑 (Salmo salar)。使用的2400只桡足幼体来自物种鲑疮痂鱼虱 (Lepeophtheirus salmonis) 产自Ilab[®] (Bergen, 挪威)。

[0281] 为了被纳入研究，幼鲑体重必须在70g~150g之间，桡足幼体必须能够主动游泳。如果幼鲑患病 (鱼鳞 (scale) 缺损、鱼鳍损伤、白内障和/或游动异常)，则不在研究中使用它们。如果桡足幼体在刺激后不动，将它们从研究中剔除。

[0282] 如果在试验期间幼鲑被游在它们的背上，则它们被排除在研究中的数据之外。在实施处理之后的1小时、24小时、72小时和120小时，测量侵染检验。在处理后的0小时、1小时、24小时、72小时和120小时，进行血液检验。

[0283] 使用每箱槽40条鱼，在两组平行组的大西洋鲑幼鲑中进行研究：一组使用顺式-9-十六烯酸的抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素片剂进行处理 (其被放置在网袋 (string bag) 下中间，其中水驻留在养殖箱槽中)，以及另一组是仅使用乙醇的对照。

[0284] 为了获得血样，两个箱槽中各自关4条鱼，并将鱼引入0.7ml/L的Benzoak[®]的麻醉浴中。在1分钟之后，使用具有0.6mm针的25ml注射器，在鱼的尾静脉中收集血样。将一滴血液放置在载玻片上，使用塑料条进行血液涂片。使用迪夫快速染色剂 (Diff-Quickstain, 其是瑞氏-姬姆萨染色剂 (Wright-Giemsa stain) 的改性的染剂)，测量来自这些血涂片的异嗜性粒细胞 (heterophils) 与淋巴细胞的比值 (H/L)。将其余的血液注入4ml的肝素化管中，并将其存储在-18℃下的冷藏箱中，直到随后的血浆皮质醇分析。通过酶联免疫吸附 (ELISA) 实验试剂盒，对全部的血浆皮质醇进行检验，其来自以1:25 (ng·ml⁻¹) 稀释的血样。

[0285] 按照以下方式，在实施处理之后的1小时、24小时、72小时和120小时进行侵染检验。两个箱槽 (对照和测试) 中各自关两条鱼，将鱼引入4个3.5L的平底烧杯 (其添加有从各鱼的原始箱槽中采样的3.5L的水)。平底烧杯配备有阀门，当等量的溶液被引入烧杯时，该

阀门能够清空0.875L的溶液。当将鱼引入烧杯中时,打开阀门。在引入鱼的10分钟之后,平底烧杯中加入0.875L的它们各自的溶液(测试或对照)。在10分钟之后(在将鱼引入平底烧杯中之后的20分钟),关闭阀门。将以每条鱼对应60只桡足幼体(的比例)加入各平底烧杯中。在加入桡足幼体5分钟后(在将鱼引入平底烧杯中之后的25分钟),打开阀门。10分钟后(在将鱼引入平底烧杯中之后的35分钟),各平底烧杯中加入它的各自处理溶液(顺式-9-十六烯酸或者对照)。在10分钟之后(在将鱼引入平底烧杯中之后的45分钟),各平底烧杯中加入它的各自处理溶液(顺式-9-十六烯酸或者对照)。10分钟后(在将鱼引入平底烧杯中之后的55分钟),各平底烧杯中加入它的各自处理溶液(顺式-9-十六烯酸或者对照)。10分钟后(在将鱼引入平底烧杯中之后的65分钟),将2ml的Benzoak[®]加入各平底烧杯中,以通过过量的麻醉品来杀死鱼。当鱼死掉时,单独将它们引入塑料袋中。

[0286] 使用手术钳,将各条鱼保持在塑料袋中,手术钳被引入鱼的鳃室。然后,在塑料袋中将鱼擦洗3次;即使用水擦洗并冲洗鱼的顶部,使用水擦洗并冲洗鱼的底部,以及使用水擦洗并冲洗整条鱼。然后,将鱼从塑料袋中拿出,然后称重。然后,将塑料袋的水内容物清空于过滤器,以收集桡足幼体。使用放大镜来统计各自过滤器上的桡足幼体的数量。

[0287] 对其它7轮的鱼,重复该工艺。

[0288] 在排除标准或试验缺陷的情况下,使用储备鱼来重复实验。为了处理丢失数据和异常值,这种类型的数据不包括在整体结果中。

[0289] 初步分析显示有利于经处理组的阳性倾向。附着于对照幼鲑上的桡足幼体的平均数量为15.4,而附着于处理组上的平均数量为10.6。这些结果显示:抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素(顺式-9-十六烯酸)迅速并有效地结合于鱼的粘液,以在封闭的3.5L的箱槽中(每条鱼对应60只桡足幼体)的高强度侵染检验中提供显著的保护。

[0290] 棕榈油酸(顺式-9-十六烯酸)和反式-9-十六烯酸的异构体可以被视为SCAIS(抑制海虱桡足幼体附着的化学信息素),负责筛选鲑鱼虱可接受的宿主。棕榈油酸(低分子量化合物,视作许多物种中的代谢产物,并且由于它的非毒性而众所周知)是用于预防鲑鱼养殖中海虱侵染的有希望的选项。

[0291] 尽管已经以各种优选实施方案的方式描述了本发明,但是技术人员会明白:可以在不脱离其范围的情况下做出各种修改、替换、省略和变化。因此,其意图是,本发明的范围由以下权利要求(包括其等同方案)的范围限定。

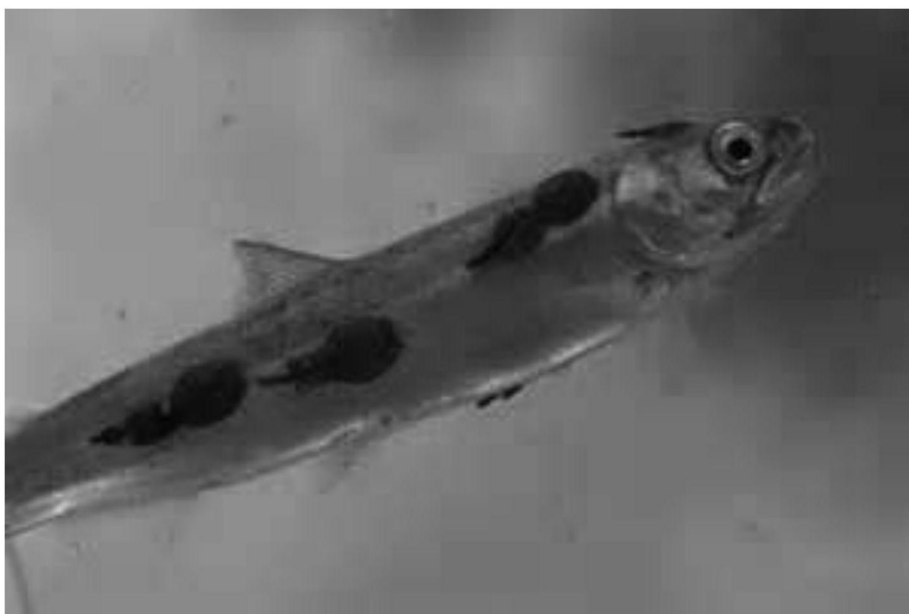


图1

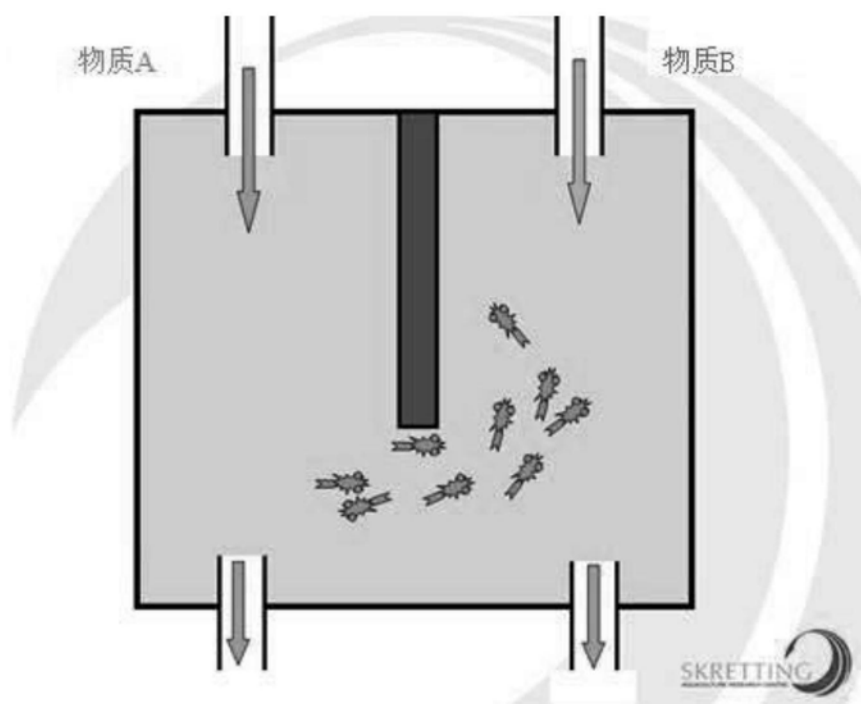


图2



图3

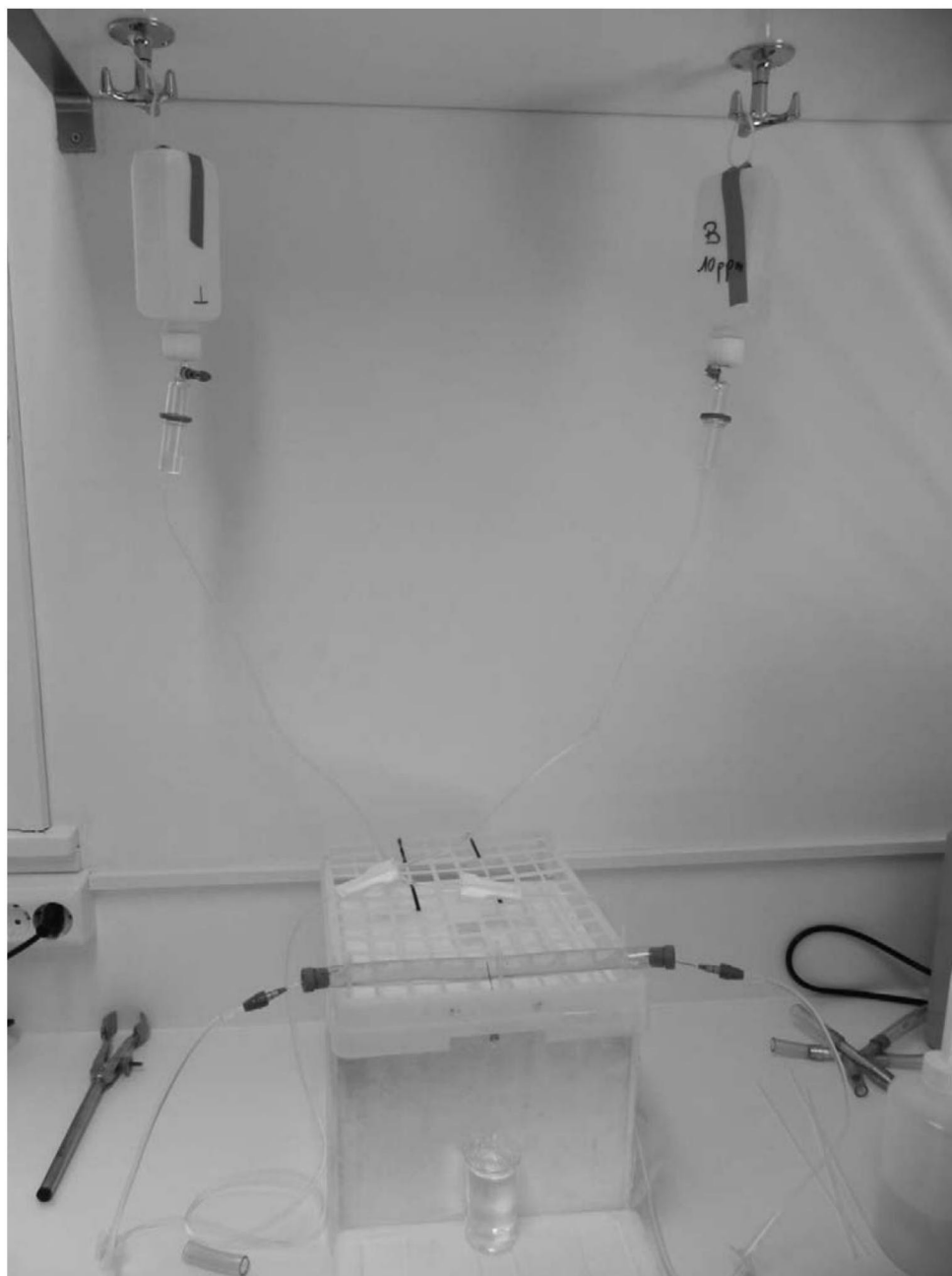


图4

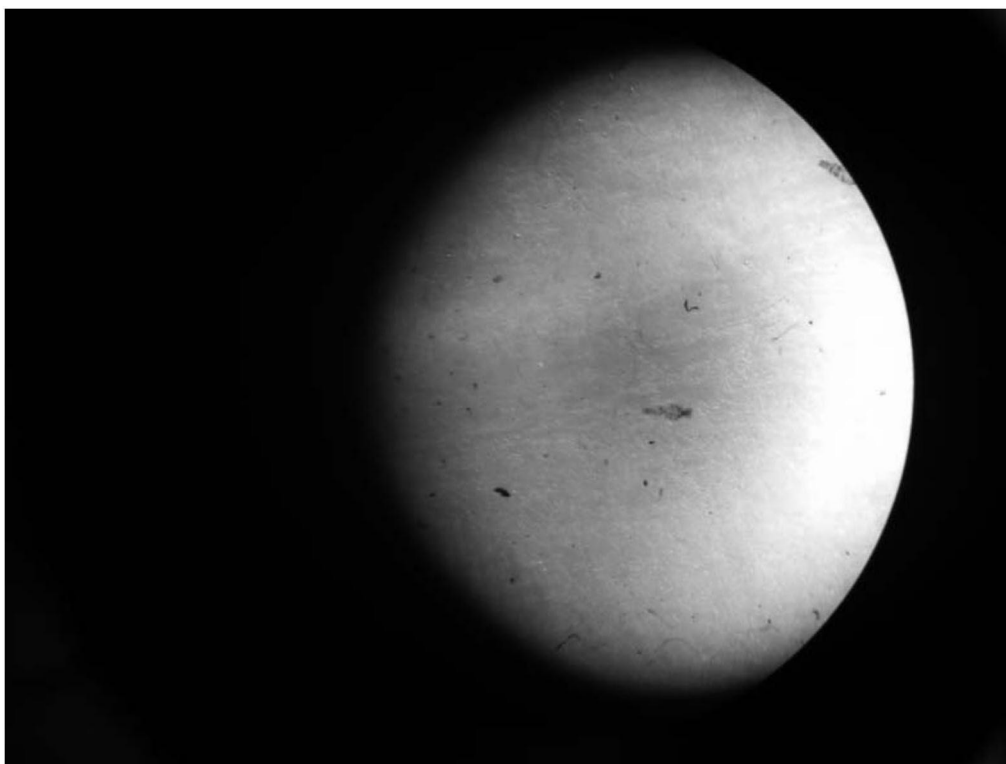


图5

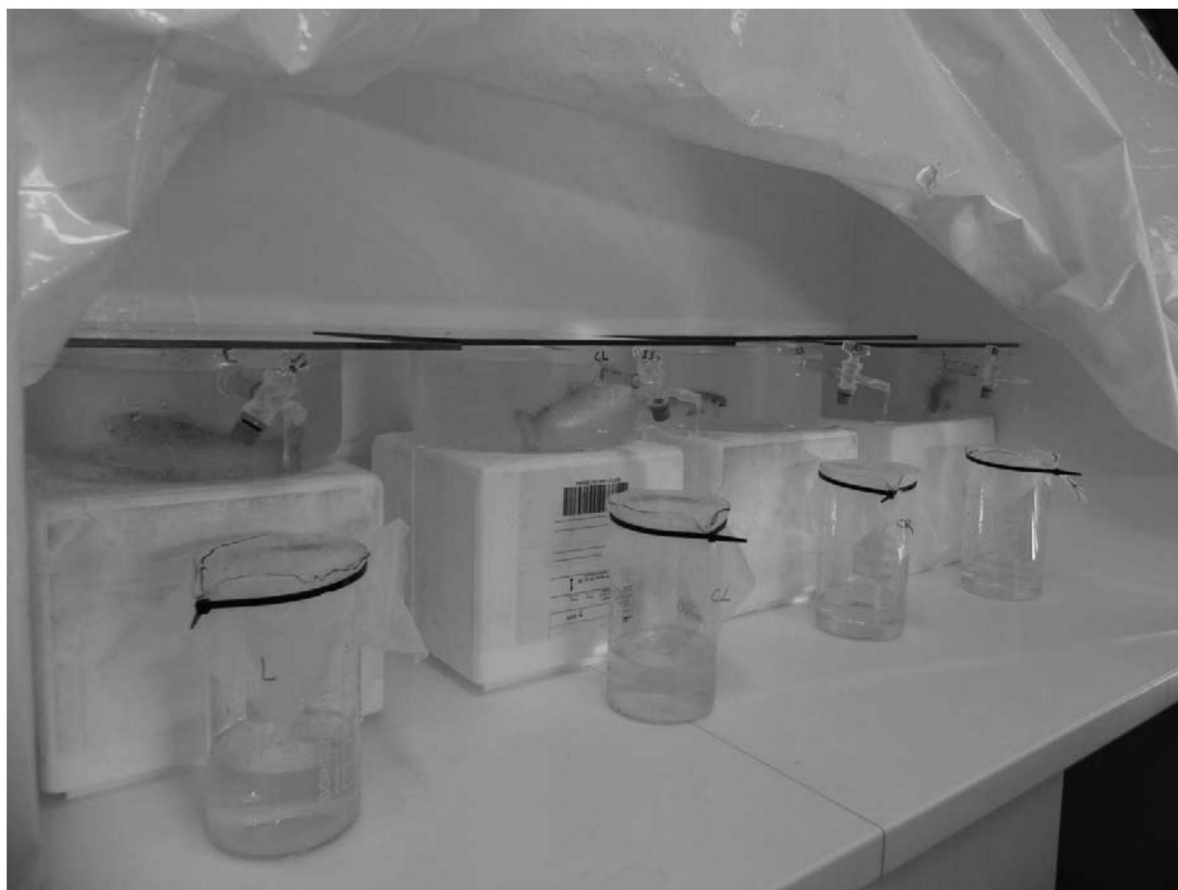


图6



图7

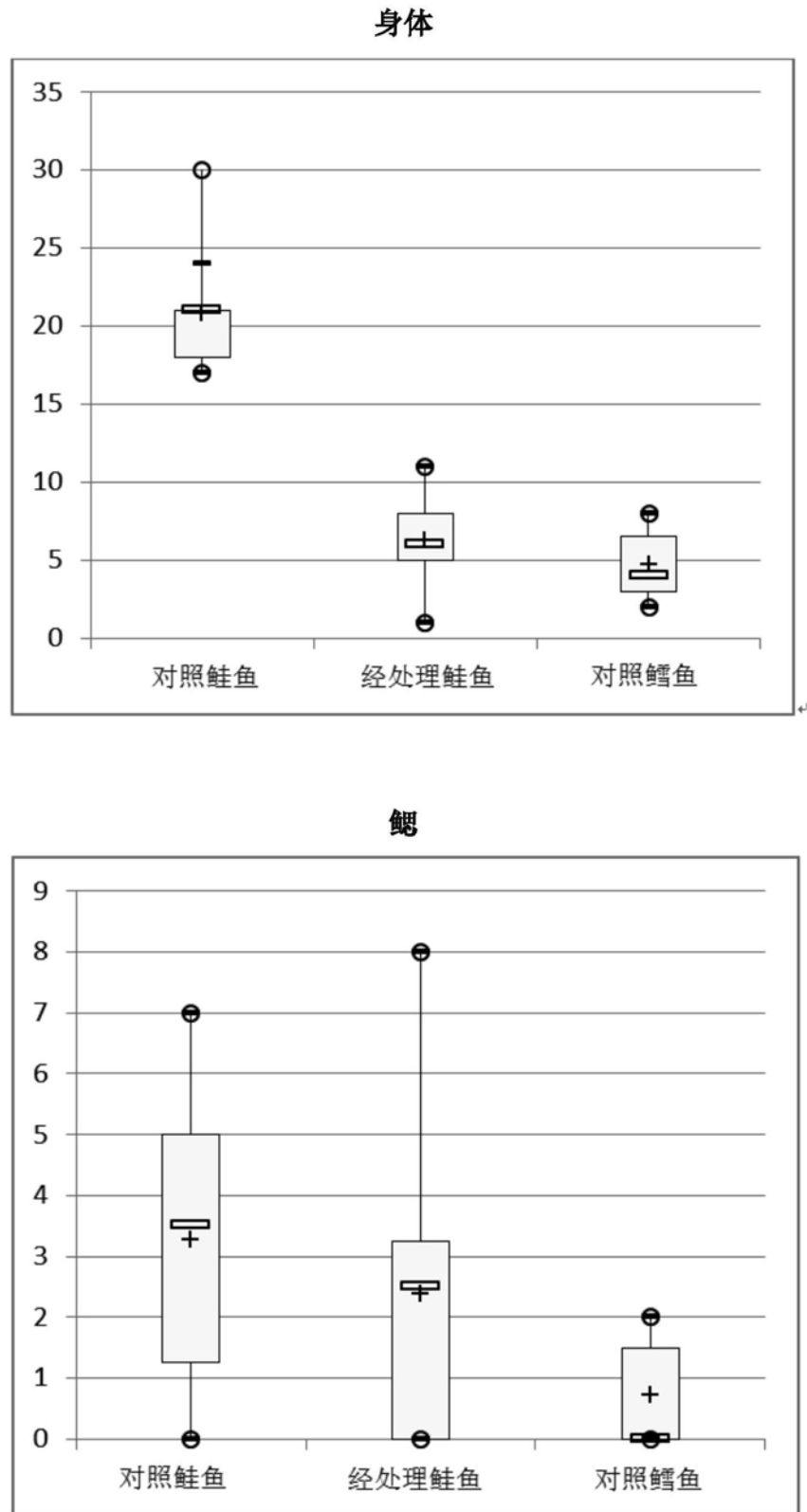


图8

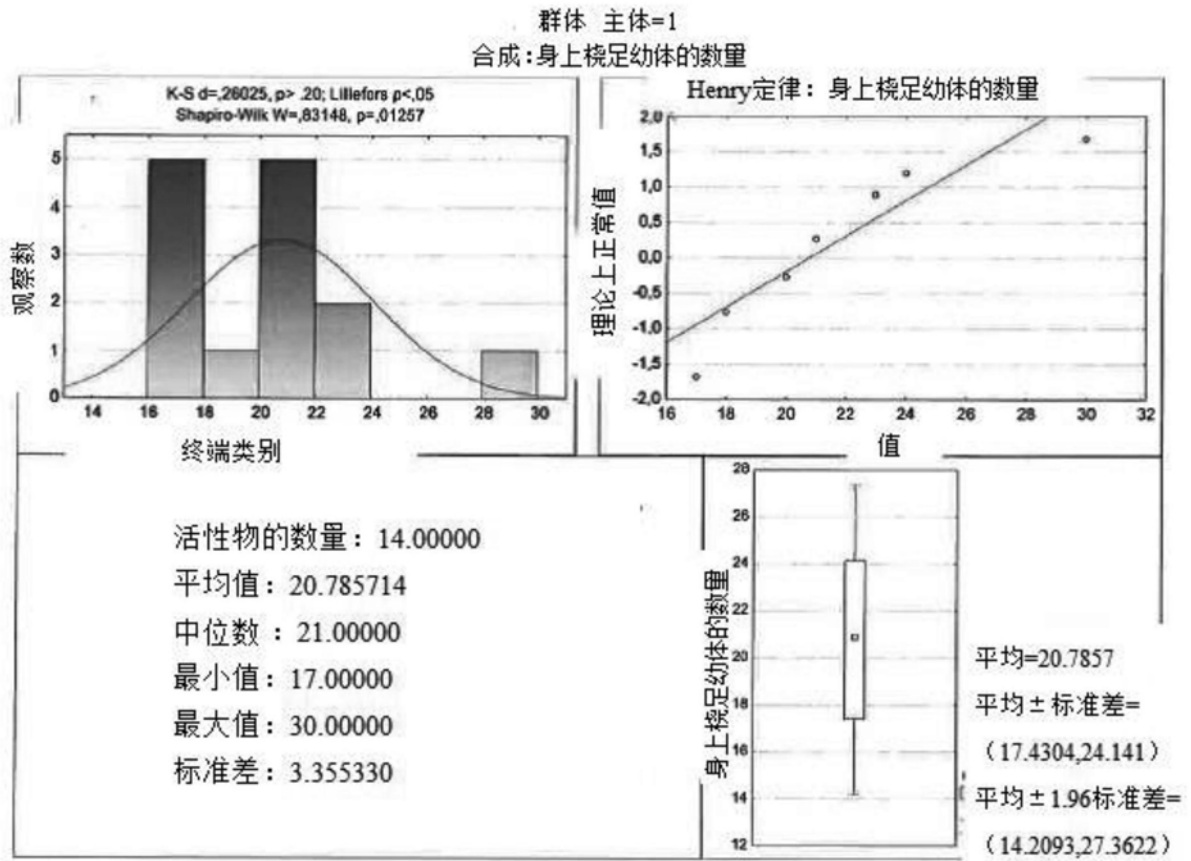


图9

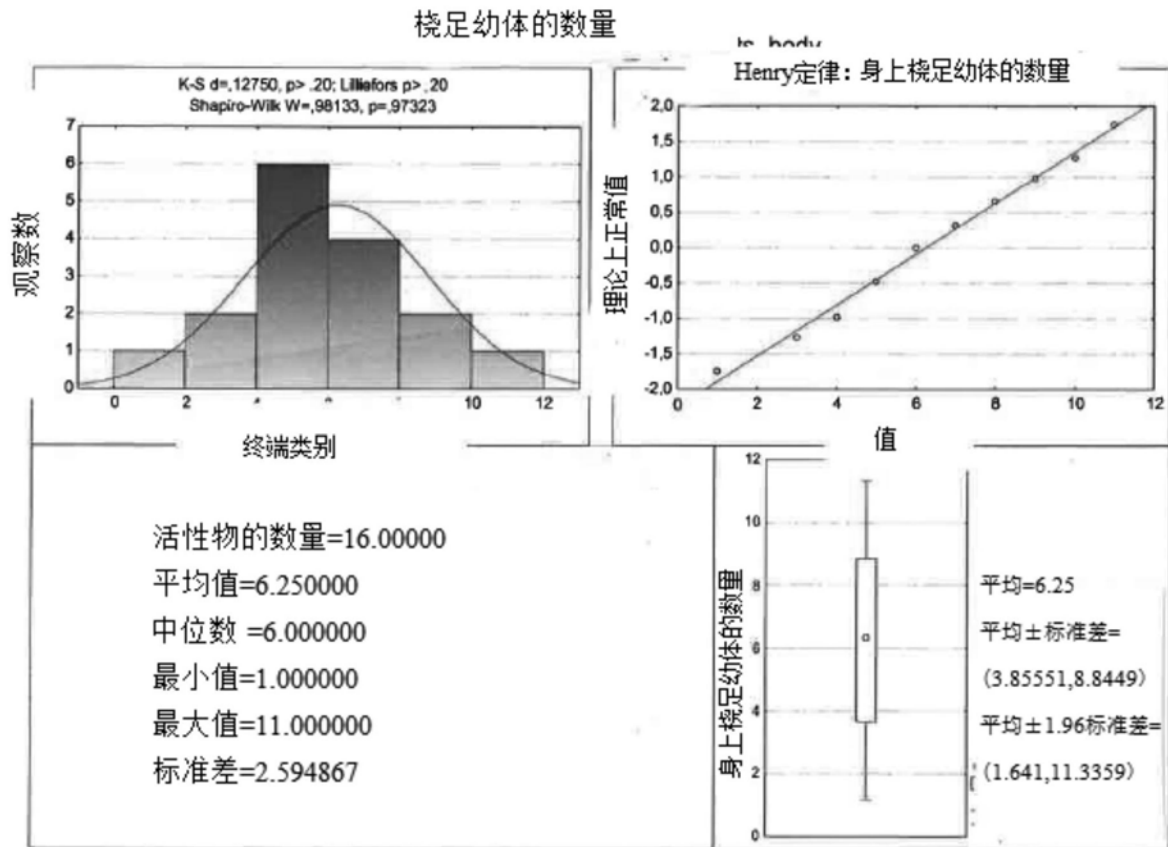


图10

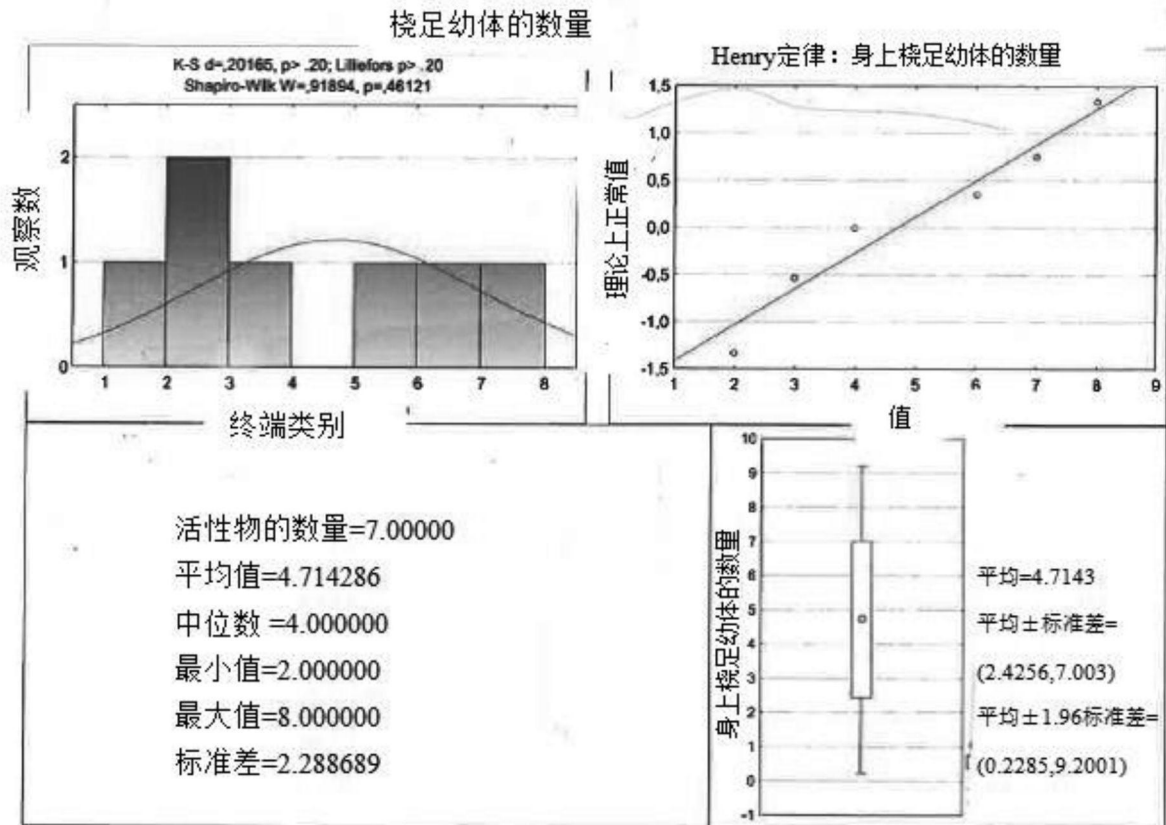


图11