



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112243346 A

(43) 申请公布日 2021.01.19

(21) 申请号 201980038085.3

(22) 申请日 2019.05.31

(30) 优先权数据

1809374.0 2018.06.07 GB

1809620.6 2018.06.12 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2019/051519 2019.05.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/234396 EN 2019.12.12

(71) 申请人 基准动物健康有限公司

地址 英国南约克郡

(72) 发明人 J·马歇尔 M·朗肖

E·阿普尔亚德

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 张小勇

(51) Int.Cl.

A01N 37/18 (2006.01)

A01N 43/40 (2006.01)

A01N 43/86 (2006.01)

A01N 47/40 (2006.01)

A01N 51/00 (2006.01)

A61K 31/426 (2006.01)

A01P 15/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页 附图2页

(54) 发明名称

用于从鱼除去外寄生虫的处理

(57) 摘要

从水中的鱼除去外寄生虫例如海虱的方法包括：(i) 施用新烟碱类化合物以从鱼除去外寄生虫；和(ii) 将包含除去的外寄生虫的水与置换水交换，从而将除去的外寄生虫和鱼分开。所述新烟碱类化合物不是吡虫啉，并且没有被配置或配制用于饲料内施用。鱼可以是鲑鱼、红点鲑鱼或清洁鱼，并且所述新烟碱类化合物可以以亚致死剂量和/或亚致死时间、致死剂量和/或致死时间、或以击倒外寄生虫的剂量施用。该方法可进一步包括防止除去的外寄生虫释放到环境中的步骤，例如通过使样品通过过滤器、优选网状过滤器从包含除去的外寄生虫的水的样品收集外寄生虫。还提供了用于所述方法的新烟碱类化合物。

1. 一种从水中的鱼除去外寄生虫的方法,包括:
  - (i) 施用新烟碱类化合物以从鱼除去外寄生虫;和
  - (ii) 将包含除去的外寄生虫的水与置换水交换,从而将除去的外寄生虫和鱼分开,其中所述新烟碱类化合物不是吡虫啉或其药学上有效的盐或酯,并且其中所述新烟碱类化合物没有被配置或配制用于饲料内施用。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述新烟碱类化合物以1-500ppm、1-200ppm、20-200ppm、1-64ppm、10-64ppm、10-50ppm、50ppm或更多、100ppm或更多、或200ppm或更多w/v的浓度施用。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中施用所述新烟碱类化合物180分钟或更短、120分钟或更短、60分钟或更短、少于30分钟、少于20分钟、15分钟或更短、少于10分钟、或5分钟或更短。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述鱼是鲑鱼、红点鲑鱼或清洁鱼。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述新烟碱类化合物以亚致死剂量和/或亚致死时间施用和/或将所述新烟碱类化合物以击倒外寄生虫的剂量施用。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述新烟碱类化合物是唯一施用的外寄生虫杀灭剂。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述新烟碱类化合物是噻虫胺、呋虫胺、啶虫脒、吡虫啉、烯啶虫胺、nithiazine、噻虫啉或噻虫嗪,或其药学上有效的盐或酯。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述新烟碱类化合物不是噻虫嗪或其药学上有效的盐或酯。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述新烟碱类化合物不是噻虫胺或其药学上有效的盐或酯。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括以下步骤:
  - (iii) 防止除去的外寄生虫释放到环境中。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中防止除去的外寄生虫的释放包括从包含除去的外寄生虫的水的样品中收集所述外寄生虫。
12. 一种净化包含外寄生虫去除剂和外寄生虫的水的方法,包括:
  - (i) 收集所述水的样品;和
  - (ii) 从样品中收集外寄生虫。
13. 根据权利要求11或权利要求12所述的方法,其中从水的样品中收集外寄生虫包括使样品通过过滤器、优选网状过滤器,任选地其中所述过滤器具有至少0.2 $\mu\text{m}$ 、至少30 $\mu\text{m}$ 、至少60 $\mu\text{m}$ 或至少150 $\mu\text{m}$ 的孔或间隙尺寸。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述外寄生虫是海虱。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中任选地通过施用外寄生虫杀灭剂杀死保持存活的外寄生虫。
16. 一种用于处理鱼的外寄生虫感染的新烟碱类化合物,其中所述新烟碱类化合物不是吡虫啉或其药学上有效的盐或酯,并且其中所述新烟碱类化合物没有被配置或配制用于饲料内施用。
17. 根据权利要求16使用的所述的新烟碱类化合物,其中将所述新烟碱类化合物施用

180分钟或更短、120分钟或更短、60分钟或更短、少于30分钟、少于20分钟、15分钟或更短、少于10分钟、或5分钟或更短。

18. 根据权利要求16或权利要求17使用的新烟碱类化合物,其中将所述新烟碱类化合物以1-500ppm、1-200ppm、20-200ppm、1-64ppm、10-64ppm、10-50ppm、50ppm或更多、100ppm或更多、或200ppm或更多w/v的浓度施用。

19. 根据权利要求16至18中任一项使用的新烟碱类化合物,其中所述外寄生虫是海虱。

20. 根据权利要求16至19中任一项使用的新烟碱类化合物,其中所述鱼是鲑鱼、红点鲑鱼或清洁鱼。

21. 根据权利要求16至20中任一项使用的新烟碱类化合物,其中所述新烟碱类化合物是噻虫胺、呋虫胺、啉虫脒、吡虫啉、烯啶虫胺、nithiazine、噻虫啉或噻虫嗪,或其药学上有效的盐或酯。

22. 根据权利要求16至21中任一项使用的新烟碱类化合物,其中所述新烟碱类化合物不是噻虫嗪或其药学上有效的盐或酯。

23. 根据权利要求16至22中任一项使用的新烟碱类化合物,其中所述新烟碱类化合物不是噻虫胺或其药学上有效的盐或酯。

24. 根据权利要求16至23中任一项使用的新烟碱类化合物,其中将所述新烟碱类化合物以亚致死剂量和/或亚致死时间施用和/或将所述新烟碱类化合物以击倒外寄生虫的剂量施用。

25. 一种用于处理鱼的外寄生虫感染的组合物,其包含一种或多种外寄生虫杀灭剂,其中所述一种或多种外寄生虫杀灭剂中的一种是根据权利要求16至24中任一项使用的新烟碱类化合物。

26. 根据权利要求25使用的组合物,其中所述组合物包含不超过一种外寄生虫杀灭剂。

## 用于从鱼除去外寄生虫的处理

[0001] 本发明涉及使用新烟碱类化合物从水中的鱼除去外寄生虫的方法,和用于处理鱼的外寄生虫感染的新烟碱类化合物,用于处理鱼的外寄生虫感染的包含一种或多种外寄生虫杀灭剂的组合物,其中所述一种或多种外寄生虫杀灭剂是新烟碱类化合物。

[0002] 水产养殖中的外寄生虫感染是重大的商业问题。此外,养殖鱼的感染能够影响野生鱼种群。然而,商业上可行的处理的数量是有限的,例如,由于涉及将化学处理剂释放到环境中的担忧以及外寄生虫产生耐药性或其他对药剂的敏感性降低。

[0003] 新烟碱类化合物是一类化学上类似于尼古丁的神经活性杀虫剂。新烟碱化合物家族包括啉虫脒、噻虫胺、吡虫啉、烯啶虫胺、nithiazine、噻虫啉和噻虫嗪。与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂相比,新烟碱类化合物在鸟类和哺乳动物中引起的毒性低于昆虫。

[0004] EP0590425非常广泛地涉及通过施用烟碱能乙酰胆碱受体的激动剂或拮抗剂来对抗鱼寄生虫的方法。EP0590425中唯一的实施例测试了吡虫啉在1ppm或100ppm下对水浴中的分离的海虱的体外活性。然而,EP0590425没有提供关于在非实验室商业环境中针对分离的海虱对鱼体内使用的合适剂量的指导。

[0005] 实际上,考虑到环境和安全问题,开发依赖于浸水施用的商业上可行的处理一直是具有挑战性的。特别是,一般认为重要的是使释放到环境中的新烟碱类化合物最小化,因为它们特别对陆地昆虫产生感知的负面影响。

[0006] W02009/010755提出了组合处理,其包含氨基甲酸酯或有机磷酸酯、拟除虫菊酯或除虫菊酯,和任选地另一种选自以下类别的分子的杀生物剂:氯代烟碱;苯基吡啶;噁二嗪;吡啶;或有机氯。但是,没有公开鱼处理的工作实例。

[0007] W02010/109187提出了组合处理,其包含拟除虫菊酯、有机磷酸酯和任选地另一种选自以下类别的分子的杀生物剂:氯代烟碱;苯基吡啶;噁二嗪;吡啶;或有机氯。但是,没有公开鱼处理的工作实例。

[0008] 因此,仍然需要对鱼中的外寄生虫进行商业上可行的浸渍处理,其能够考虑安全性、环境和处理抗性问题的。

[0009] 因此,本发明的一个方面提供了一种从水中的鱼除去外寄生虫的方法,包括:(i)施用新烟碱类化合物以从鱼除去外寄生虫;(ii)将含有除去的外寄生虫的水与置换水交换,从而将除去的外寄生虫和鱼分开,其中新烟碱类化合物不是吡虫啉或其药学上有效的盐或酯,并且其中新烟碱类化合物没有被配置或配制用于饲料内施用。

[0010] 优选地,处理是浸渍处理。

[0011] 优选地,处理不是饲料内处理。

[0012] 因此,新烟碱类化合物杀死海虱或以其他方式使海虱在鱼上不动是不够的。相反,必须将海虱与鱼分开,以便能够收集海虱(无论是活的还是死的)任选地用于单独杀死。因此,该方法使得能够处理外寄生虫感染,而不需要使用化学处理杀死外寄生虫,而是将外寄生虫和鱼分开,以便可以捕获外寄生虫。通过该方法除去的每个外寄生虫将处于以下状态之一:存活;垂死;和杀死。这是特别有利的,因为在从鱼除去之前杀死外寄生虫的处理需要对鱼进行进一步处理以从鱼除去被杀死并且通常因此紧密固定的外寄生虫。在水产养殖方

面,该方法还提供相对不含、基本上不含或完全不含海虱污染的鱼产品。

[0013] 因此,本发明的方法有利地用于除去表现出对外寄生物杀灭剂具有一定程度的抗性(这能够增加杀死外寄生虫所需的剂量至不切实际或太昂贵而不能实现的水平)的外寄生虫群体。在这方面,本发明提供了处理抗性的解决方案。

[0014] 在本发明的实施方案中,外寄生虫处于运动生命周期阶段。在本发明的其他实施方案中,外寄生虫处于非运动生命周期阶段。在外寄生虫群体中,外寄生虫可以处于运动和非运动生命周期阶段。因此,在本发明的实施方案中,处理可以有效对抗运动和非运动生命周期阶段。

[0015] 在本发明的实施方案中,新烟碱类化合物以1-500ppm、1-200ppm、20-200ppm、1-64ppm、10-64ppm、10-50ppm、50ppm或更多、100ppm或更多、或200ppm或更多w/v的浓度施用。

[0016] 在本发明的示范性实施方案中,新烟碱类化合物以1、2、5、10、15、20、25、30、50、64、100、200或500ppm w/v的浓度施用。

[0017] 通常,新烟碱类化合物以15ppm w/v或20ppm w/v的浓度施用。

[0018] 在具体的实施方案中,新烟碱类化合物以100ppm w/v或更高的浓度施用5-15分钟,优选200ppm w/v或更高的浓度施用5-15分钟。

[0019] 在本发明的实施方案中,施用新烟碱类化合物的时间足以从鱼除去50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或所有的外寄生虫。

[0020] 因此,该方法可以包括使得能够推导出适当的有效时间的步骤。因此,该方法可包括在施用新烟碱类化合物后监测海虱以评估可接受的去除水平(例如去除百分比),并因此得出达到可接受的去除水平所需的剂量和时间。然后在知晓可能达到可接受的去除水平的情况下,能够在现场应用该方法时使用这些参数而无需监测去除水平。

[0021] 通常,新烟碱类化合物施用180分钟或更短、120分钟或更短、60分钟或更短、少于30分钟、少于20分钟、15分钟或更短、少于10分钟、或5分钟或更短。

[0022] 在本发明的实施方案中,鱼是鲑鱼(salmonid)、红点鲑鱼(char)或清洁鱼。在本发明的具体实施方案中,鲑鱼是三文鱼(salmon)或鳟鱼(trout)。在本发明的具体实施方案中,清洁鱼来自以下科:Cyclopteroidea或隆头鱼科(Labridae)。

[0023] 新烟碱类化合物可以以亚致死剂量和/或亚致死时间施用。

[0024] “亚致死”可能与处理的剂量和/或时间有关。它可以根据杀死外寄生虫所需的剂量和/或时间的知识来定义。在一些实施方案中,“亚致死”与杀死外寄生虫所需的剂量和/或时间有关,所述外寄生虫已对外寄生物杀灭剂产生一定程度的抗性。在优选的实施方案中,亚致死性是不会杀死群体中所有外寄生虫的处理,任选地在4-32°C的温度。

[0025] 因此,本发明的实施方案不要求外寄生虫一开始就被新烟碱类化合物杀死,而是诱导它们从鱼释放或跳下。这最小化了潜在危险的药剂在现场的使用。最小化施用时间在现场(其中处理围场可能不完全与周围环境隔离,并因此可能发生活性物质泄漏)是有用的。在整个处理时间种必须保持这种情况下的浓度,因此缩短处理时间可以使药剂进入环境的损失最小化。

[0026] 新烟碱类化合物可以以致死剂量和/或致死时间施用。

[0027] 新烟碱类化合物可以以击倒(knockdown)外寄生虫的剂量施用。

[0028] 在本发明的实施方案中,新烟碱类化合物在4-32°C、4-24°C、4-18°C、4-16°C、5-15

℃、10-14℃或12-14℃的温度施用。

[0029] 在本发明的实施方案中,新烟碱类化合物是处理期间施用的唯一外寄生虫杀灭剂。这比组合处理更有利,因为预期组合处理由于更多的非靶效应而具有更大的负面环境影响并且增加了产生抗性的可能性。

[0030] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是吡虫啉或其药学上有效的盐或酯。在本发明的其他实施方案中,新烟碱类化合物可以是噻虫胺、呋虫胺、啉虫脒、烯啶虫胺、nithiazine、噻虫啉或噻虫嗪,或它们的药学上有效的盐或酯。

[0031] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是噻虫胺、呋虫胺、吡虫啉或噻虫嗪,或它们的药学上有效的盐或酯。在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是噻虫胺。在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是呋虫胺。

[0032] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物不是噻虫嗪,或它们的药学上有效的盐或酯。

[0033] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物不是噻虫胺,或它们的药学上有效的盐或酯。

[0034] 在本发明的实施方案中,该方法还包括步骤:(iii)防止除去的外寄生虫释放到环境中。这可以采取从包含除去的外寄生虫的水样品中收集外寄生虫的形式。

[0035] 优选地,水样品是该方法中使用的所有水。

[0036] 在本发明的实施方案中,该方法还包括收集除去的外寄生虫,任选地浓缩外寄生虫,并杀死保持存活的所有寄生虫。这有利于确保外寄生虫死亡,其中新烟碱类化合物被认为杀死外寄生虫,或者已知新烟碱类化合物剂量方案不杀死外寄生虫,而仅仅除去外寄生虫。这有助于避免引起外寄生虫或外寄生虫群对新烟碱类化合物的脱敏的问题。杀死保持存活的所有寄生虫可以通过任何合适的方法实现,例如机械或化学方法,通常通过施用外寄生虫杀灭剂进行。

[0037] 在本发明的实施方案中,已经在诸如活鱼舱船的隔离环境中处理过的鱼被释放回到环境诸如海围栏中。

[0038] 在本发明的具体实施方案中,通过使样品通过过滤器、优选诸如筛的网状过滤器收集外寄生虫(无论是活的、死的、垂死的和/或敲低的),包括当存在时它们的卵块袋。本领域技术人员将能够获得并使用用于该目的的适当指定的过滤器。过滤器可具有至少0.2 $\mu\text{m}$ 、至少0.45 $\mu\text{m}$ 、至少5.0 $\mu\text{m}$ 、至少10 $\mu\text{m}$ 、至少30 $\mu\text{m}$ 、至少60 $\mu\text{m}$ 或至少150 $\mu\text{m}$ 的孔或间隙尺寸,例如约150、60、30或0.2 $\mu\text{m}$ 。举例来说,用于海虱的合适的网状过滤器将具有约150 $\mu\text{m}$ 的间隙尺寸。

[0039] 如本文所用,术语“击倒”是指在暴露于农药期间外寄生虫响应于农药例如新烟碱类化合物而物理地离开宿主如鱼而采取的动作。因此,已经被“击倒”的外寄生虫是指在暴露于农药期间特别是响应于农药而已经物理地离开宿主的外寄生虫。

[0040] 本发明的一个方面提供了一种用于净化包含外寄生虫去除剂和外寄生虫的水的方法,包括:

[0041] (i) 收集所述水的样品;和

[0042] (ii) 从样品中收集外寄生虫。

[0043] 从水的样品中收集外寄生虫包括使样品通过网状过滤器。例如,网状过滤器可具

有至少60 $\mu\text{m}$ 或至少150 $\mu\text{m}$ 的间隙尺寸。

[0044] 在实施方案中,外寄生虫是海虱。

[0045] 本发明还进一步包括在任选地浓缩所述外寄生虫后杀死除去的保持存活的外寄生虫。其中任选地通过施用外寄生虫杀灭剂杀死保持存活的外寄生虫。

[0046] 本发明的一个方面提供一种用于处理鱼的外寄生虫感染的新烟碱类化合物,其中新烟碱类化合物不是吡虫啉或其药学上有效的盐或酯,并且其中新烟碱类化合物没有被配置或配制用于饲料内施用。

[0047] 优选地,施用新烟碱类化合物80分钟或更短、120分钟或更短、60分钟或更短、少于30分钟、少于20分钟、15分钟或更短、少于10分钟或5分钟或更短。

[0048] 优选地,新烟碱类化合物被配置或配制用于通过浸渍施用。

[0049] 本发明人已经发现新烟碱类化合物对外寄生虫在其生命周期的运动阶段更有效。因此,在本发明的实施方案中,外寄生虫处于运动生命周期阶段。在本发明的其他实施方案中,外寄生虫处于非运动生命周期阶段。在外寄生虫群体中,外寄生虫可以处于运动和非运动生命周期阶段。因此,在本发明的实施方案中,处理可以有效对抗运动和非运动生命周期阶段。

[0050] 在本发明的实施方案中,以1-500ppm、1-200ppm、20-200ppm、1-64ppm、10-64ppm、10-50ppm、50ppm或更多、100ppm或更多、或200ppm或更多w/v的浓度施用新烟碱类化合物。

[0051] 在本发明的示例性实施方案中,新烟碱类化合物以1、2、5、10、15、20、25、30、50、64、100、200或500ppm w/v的浓度施用。

[0052] 通常,新烟碱类化合物以15ppm w/v或20ppm w/v的浓度施用。

[0053] 在具体的实施方案中,以100ppm w/v或更高的浓度施用新烟碱类化合物5-15分钟,优选200ppm w/v或更高的浓度施用新烟碱类化合物5-15分钟。

[0054] 因此,新烟碱类化合物提供了一种安全有效的手段以从现场(其可以是例如活鱼舱船(well boat))中的鱼除去外寄生虫。

[0055] 活鱼舱船环境带来了独特的挑战,因为空间和时间对于处理是受限的,并且存在与确保处理过的海虱不会释放到环境中相关的额外风险。尽管存在这些挑战,但本发明有利地成功地处理现场中的海虱,并且例如避免需要活鱼舱船返回岸上,或者将其水泵离送到另一船舶以便处理或运输到岸上,用于从处理水中除去海虱。

[0056] 本发明可以适合在任何隔离区域中使用或进行,这避免了外寄生虫杀灭剂或除去的海虱释放到环境中。本发明的实施方案在活鱼舱船上进行。

[0057] 令人惊讶的是,本发明人发现使用新烟碱类化合物比甲基吡啶磷或溴氰菊酯更有效除去外寄生虫。

[0058] 新烟碱类化合物被认为对所有外寄生虫都有效。然而,在本发明的实施方案中,外寄生虫是海虱。在具体的实施方案中,海虱是*Lepeophtheirus salmonis* (*L. salmonis*)。在具体的实施方案中,海虱是鱼虱(*Caligus*)的种,例如*Caligus elongatus*或*Caligus rogercresseyi*。

[0059] 新烟碱类化合物被认为对所有鱼的外寄生虫感染有效。在本发明的实施方案中,所述鱼是鲑鱼、红点鲑鱼或清洁鱼。在本发明的具体实施方案中,鲑鱼是三文鱼或鳟鱼。在本发明的具体实施方案中,清洁鱼来自以下科:*Cyclopteroidea*或隆头鱼科。

[0060] 在本文所述的本发明的所有方面和实施方案中,术语“清洁鱼”是指通过除去不希望的物质例如死皮和/或外寄生虫为其他鱼类提供服务的鱼的种。在本发明的任何实施方案中,清洁鱼可以是选自以下的一种或多种:圆鳍鱼(lumpfish/lumpsucker) (*Cyclopterus lumpus*);隆头鱼科的濼鱼;青鲈(*Tautogolabrus adspersus*);和patagonian blennie (*Eleginops maclovinus*)。隆头鱼科的濼鱼可以是选自以下的一种或多种:ballan wrasse (*Labrus bergylta*);corkwing wrasse (*Symphodus melops*);rock cook Wrasse (*Centrolabrus exoletus*);goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*);和cuckoo wrasse (*Labrus mixtus*)。在本发明的特定实施方案中,清洁鱼是圆鳍鱼或濼鱼。

[0061] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是吡虫啉或其药学上有效的盐或酯。在本发明的其他实施方案中,新烟碱类化合物可以是噻虫胺、呋虫胺、啉虫脒、烯啶虫胺、nithiazine、噻虫啉或噻虫嗪,或它们的药学上有效的盐或酯。

[0062] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是噻虫胺、呋虫胺、吡虫啉或噻虫嗪,或它们的药学上有效的盐或酯。在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是噻虫胺。在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物是呋虫胺。

[0063] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物不是噻虫嗪,或它们的药学上有效的盐或酯。

[0064] 在本发明的具体实施方案中,新烟碱类化合物不是噻虫胺,或它们的药学上有效的盐或酯。

[0065] 本发明的实施方案不要求外寄生虫一开始就被新烟碱类化合物杀死。相反,外寄生虫被诱导从鱼释放或跳下,并且每个被除去的外寄生虫将处于以下状态之一:存活;垂死;和杀死。外寄生虫可能已被击倒。当处理用海虱的混合群体(其可以例如对所用的外寄生虫杀灭剂具有不同的敏感性)感染的鱼时,除去的海虱群体更可能处于两种或更多种状态的混合。因此,虽然这些实施方案不要求一开始就杀死外寄生虫,但在处理期间将杀死一些或全部。在要求释放但不杀死外寄生虫的实施方案中,新烟碱类化合物可以以亚致死剂量和/或亚致死时间施用。该实施方案有利地用于除去对外寄生虫杀灭剂具有一定程度的抗性(这能够将杀死外寄生虫所需的剂量增加到不实用或太昂贵而无法实现的水平)的外寄生虫群体。在这方面,本发明提供了处理抗性的解决方案。

[0066] 在其他实施方案中,新烟碱类化合物以致死剂量和/或致死时间施用。

[0067] 在其他实施方案中,新烟碱类化合物以击倒外寄生虫的剂量施用。

[0068] 在亚致死处理中,调节因素和良好实践可能要求采取措施以避免将除去的外寄生虫释放到环境中。因此,本发明的实施方案包括防止除去的外寄生虫释放到环境中的最后步骤。

[0069] 在本发明的实施方案中,新烟碱类化合物的施用温度为4-32°C、4-24°C、4-18°C、4-16°C、5-15°C、10-14°C或12-14°C。

[0070] 本发明的另一方面提供用于处理鱼的外寄生虫感染的组合物,其包含一种或多种外寄生虫杀灭剂,其中一种或多种外寄生虫杀灭剂中的一种是根据本发明使用的新烟碱类化合物。

[0071] 在本发明的具体实施方案中,组合物包含一种外寄生虫杀灭剂。也就是说,该组合物仅包含新烟碱类化合物,并且不包括其他形式的外寄生虫杀灭剂。

[0072] 因此,例如,本发明的实施方案提供了包含新烟碱类化合物的组合物,但不包含选自以下的一种或多种药剂:氨基甲酸酯;有机磷酸盐;拟除虫菊酯;除虫菊酯;氯代烟碱;苯基吡啶;噁二嗪;吡啶;或有机氯。

[0073] 现在将参考附图以示例的方式描述本发明,其中:

[0074] 图1显示了用五种浓度(0、10、15、20和25mg/l)的吡虫啉浸渍处理从三文鱼除去的虱子的比例;

[0075] 图2显示了在10mg/l和20mg/l吡虫啉处理下,作为以分钟计的处理持续时间( $n=10$ ;  $t \leq 56$ 分钟)的函数的被感染的鱼的比例的Kaplan-Meier图;

[0076] 图3显示了吡虫啉、呋虫胺和噁虫胺以及暴露时间在最大暴露时间对虱子被清除的鱼的作用;和

[0077] 图4显示了在处理结束时、暴露后24小时吡虫啉、呋虫胺和噁虫胺组虱子不管其位置(在鱼上或不在鱼上)的反应性。

## 实施例

[0078] 实施例1-用10、30和50ppm吡虫啉处理

[0079] 1.1海虱攻击

[0080] 设置了8个流通式处理槽,每个处理槽含有15条鱼。鱼是三文鱼(大西洋三文鱼(*Salmo salar*)),平均重量约为270克,并且是混合性别的。收集从产卵雌性 *Lepeophtheirus salmonis* 除去的卵块袋并进行培养直至产生感染性桡足类幼体。将含有约330-350个桡足类幼体的8个瓶子各自随机分配到处理槽中(以提供平均22个虱子/条鱼)。

[0081] 在准备攻击时,停止槽中的水流并降低光照水平。然后将虱子加入每个槽中,并将槽保持在完全黑暗中6小时,之后升高光照水平并恢复水流。

[0082] 用海虱对鱼进行一周或六周的攻击。

[0083] 1.2处理

[0084] 1.2.1攻击一周后的处理

[0085] 在海虱攻击后一周,用10ppm w/v、30ppm w/v或50ppm w/v吡虫啉处理三个槽中的鱼。一个槽用0.03%DMSO处理,另一个槽用海水处理作为对照。

[0086] 对于每个处理槽,将适量的吡虫啉(参见表1)溶解在100ml DMSO中并与来自实验槽的约900ml海水混合以获得处理溶液。停止实验槽上的水流,然后加入处理溶液。

[0087] 将鱼在充分通气的静水中暴露60分钟并在暴露期间进行观察。在暴露期结束时,将水迅速排出至约1/3体积,然后恢复槽中的流动。

[0088] 表1

组	处理类型	槽体积 (升)	处理中使用的吡虫啉的重量 (g)	处理点, 虱子攻击后的周数
组 1	对照-海水	N/A	-	1 周
组 2	对照-海水/DMSO	N/A	-	1 周
组 3	10 ppm 吡虫啉	273.2	2.73	1 周
[0089] 组 4	30 ppm 吡虫啉	271.6	8.15	1 周
组 5	50 ppm 吡虫啉	288.2	14.41	1 周
组 6	10 ppm 吡虫啉	293.3	2.9	6 周
组 7	30 ppm 吡虫啉	278.4	8.4	6 周
组 8	50 ppm 吡虫啉	292.0	14.6	6 周

### [0090] 1.2.2 暴露六周后的处理

[0091] 在用海虱攻击鱼后六周,用10ppm w/v、30ppm w/v或50ppm w/v吡虫啉处理剩余三个处理槽中的鱼。在攻击后一周以与处理槽相同的方式进行处理(参见1.2.1)。添加到各处理槽中的吡虫啉的量示于表1中。

[0092] -50ppm w/v的观察

[0093] 在加入吡虫啉后2至6分钟内进行的观察期间,在50ppm w/v处理组的水柱中未观察到虱子。

[0094] 处理12分钟后,观察到大约10只虱子从宿主上脱落并游离在水柱中。处理18分钟后,在水柱中观察到约20只虱子。在这些虱子中没有记录到自主运动。加入吡虫啉后44分钟,注意到虱子在槽底部保持不活动。此外,只有五条鱼被注意到被感染,每条鱼具有单个虱子。加入吡虫啉后53分钟,只有2-3条鱼似乎有单个虱子的感染。加入吡虫啉后58分钟,只在一条鱼上有一只虱子。加入吡虫啉后81分钟,在鱼上没有见到虱子。

[0095] 处理后两天,注意到先前与进料和虱子的附着相关的病变几乎完全得到解决。

[0096] -30ppm w/v的观察

[0097] 在加入10分钟后在含有用30ppm w/v吡虫啉处理过的鱼的槽的水柱中观察到大约1-2只虱子。加入后18分钟,水柱中约存在10只虱子。加入后25分钟,在水中注意到大约20只虱子,并且少于6条鱼看起来被估计每条鱼1-2只虱子感染。加入吡虫啉后33分钟,大多数鱼被认为对于任何虱子感染是阴性的。离开宿主的所有虱子都是不动的。添加47分钟后,只有3条鱼看起来被感染,每条鱼具有单个虱子。加入吡虫啉后59分钟,没有鱼明显感染虱子。在加入吡虫啉后78分钟,个体虱子似乎重新附着到4条鱼上,其中在4条鱼上观察到1只虱子。6分钟后,在这些鱼上没有观察到虱子,并且槽中的所有虱子都是不动的。

[0098] 处理后两天,注意到先前与进料和虱子的附着相关的病变几乎完全得到解决。

[0099] -10ppm w/v的观察

[0100] 在加入吡虫啉后的最初19分钟内未在水柱中观察到虱子。加入后21分钟,观察到几只虱子在水柱中活跃游动。四分钟后,这些虱子中的大多数都是不动的。加入后54分钟,注意到2条感染的鱼,每条被单个产卵雌性虱子寄生。加入后86分钟,观察到单个雌性虱子从其宿主上脱落。虽然没有直接观察到,但仍注意到剩余的产卵雌性已从其宿主脱落。加入后91分钟,观察到单个雄性虱子在其宿主头部。在处理后至少五天,仍在其宿主上观察到该虱子。

[0101] 1.2.3终止

[0102] 在用海虱攻击鱼后八周,研究终止。将鱼在MS222(甲磺酸三卡因)中过度麻醉并使用Iki Jime工具毁脑。记录每条鱼的长度和重量以及外部症状。从每条鱼中取出所有虱子并记录性别和发育阶段。将虱子储存在乙醇中并使用立体显微镜确认性别和阶段。

[0103] 最后的虱子计数是盲法进行的,结果显示在表2中。数据表示为发病率和丰度。发病率定义为感染寄生虫的种的一个或多个个体的宿主数量除以检查的宿主数量(包括感染和未感染的宿主)并以百分比表示。

[0104] 表2

处理	发病率	雄性成虫虱子的丰度(和范围)	雌性成虫虱子的丰度(和范围)	产卵雌性的丰度(和范围)	所有虱子阶段的平均丰度(和范围)
DMSO对照	100	1.2 (0-4)	0 (0-0)	1.47 (0-4)	2.67 (1-6)
海水对照	93.33	2 (0-7)	0.067 (0-1)	1.8 (0-6)	3.87 (0-11)
1周攻击+ 10 ppm 吡虫啉	100	0.87 (0-2)	0.067 (0-1)	1.47 (0-3)	2.4 (1-5)
1周攻击+ 30 ppm 吡虫啉	93.33	0.8 (0-1)	0 (0-0)	1.4 (0-3)	2.2 (0-4)
1周攻击+ 50 ppm 吡虫啉*	100	1.23 (0-3)	0 (0-0)	1.69 (0-5)	2.92 (0-7)
6周攻击+ 10 ppm 吡虫啉	0	0	0	0	0
6周攻击+ 30 ppm 吡虫啉	0	0	0	0	0
6周攻击+ 50 ppm 吡虫啉	0	0	0	0	0

[0105] \*从该处理组中取出两条鱼。鱼1:叉长316mm,总重452g。回收到3只雄性成虫和6只雌性成虫。鱼2:叉长290mm,总重379g。回收到1只雄性成虫和1只雌性成虫。

[0106] 在第8周检查的鱼上的所有虱子阶段的感染发病率在两个对照组之间以及在攻击后一周用10、30或50ppm w/v的吡虫啉处理的鱼中不被认为是不同的。然而,如上所述,在海虱攻击后六周,从用10、30或50ppm w/v吡虫啉处理的鱼中没有回收到虱子。该处理被认为在所有处理剂量下针对虱子的运动寄生阶段100%有效。

[0107] 与DMSO对照相比,在攻击后一周处理的鱼中没有观察到总体虱子丰度的显著差异;与海水对照相比,虱子丰度的微小差异是明显的-这不被认为是显著的。类似地,观察到在从攻击后一周处理的鱼和对照组中回收的雄性虱子的丰度之间的有限差异。在来自攻击后一周处理的鱼和对照组的产卵雌性的丰度中没有注意到显著差异。

[0108] 实施例2-处理浓度的优化

[0109] 2.1海虱攻击

[0110] 将120只三文鱼(大西洋三文鱼)分至五个流通式处理槽,并在寄生虫攻击前适应24小时。

[0111] 收集从产卵雌性Lepeophtheirus salmonis取出的卵块袋并进行培养直至产生感染性桡足类幼体。然后将桡足类幼体均匀地分配到含有海水的五个瓶中,并在约10℃下储

存过夜。在准备攻击时,停止处理槽中的水流并降低光照水平。将 $650 \pm 20$ 个桡足类幼体(每个宿主约27个)加入到静水中,并将槽保持在完全黑暗中7小时,之后提高光照水平并恢复水流。

[0113] 2.2相对功效研究

[0114] 将鱼随机分成10组,每组10条鱼,并保持在含有30L水和高通气的静态“处理桶”中,如表3所示。

[0115] 表3

组	吡虫啉浓度 (mg/l)	处理持续时间(分钟)	重复次数	鱼总数/重复
1 & 2	0	60	2	10
3 & 4	10	60	2	10
5 & 6	15	60	2	10
7 & 8	20	60	2	10
9 & 10	25	60	2	10

[0117] 用所需浓度的吡虫啉处理组中的8个组(3-10)60分钟:将吡虫啉溶解在DMSO中并加入到约1L槽水中,然后加入到处理桶中。剩余的组及其重复(1&2)是0.03%的DMSO对照。

[0118] 密切监测实验动物的不良反应和寄生虫感染的状态。在可能的情况下,记录所有寄生虫被认为已脱落的时间。由于在静态系统中进行处理,因此在整个过程中定期监测温度和溶解氧,并根据需要调节通气。

[0119] 在处理期后,将测试动物从处理溶液中取出并人工安乐死。对每条鱼进行称重、测量,并评估其个体寄生虫负荷。还计算处理溶液中寄生虫的数量并定性评估:性别和成熟度,新烟碱类化合物中毒的明显迹象,和/或潜在的恢复。

[0120] -结果

[0121] 在与0.03%浓度的DMSO组合的4种处理浓度10、15、20和25mg/l的吡虫啉下除去的虱子的总比例显示在表4和图1中( $n=2, t=60$ 分钟,误差条表示 $\pm$ SEM)。

[0122] 表4

组	吡虫啉浓度 (mg/l)	重复次数	第一条鱼出来 (添加吡虫啉后的分钟数)	最后一条鱼出来 (添加吡虫啉后)	估计的总寄生虫清除率(添加吡虫啉后的分钟数)
1	0	1	60	65	n/a
2	0	2	60	65	n/a
3	10	1	60	65	n/a
4	10	2	60	65	46
5	15	1	58	64	33
6	15	2	60	66	43
7	20	1	59	64	32
8	20	2	60	65	38
9	25	1	60	66	31
10	25	2	60	66	22

[0124] 在60分钟的处理期间,所有四种处理剂量均除去了80-100%的寄生虫感染。

[0125] 逻辑回归用于比较用每种浓度处理后的寄生虫清除率。使用Rv.2.13.0中的glm函数进行逻辑回归分析,并假设二项式或准二项式误差分布(通过零偏差与自由度的比较确定)。

[0126] 所有处理浓度下的寄生虫清除率被确定为显著大于0mg/l下的寄生虫清除率 ( $p < 0.01$ )。尽管25mg/l下的清除率 ( $97 \pm 3\%$ ) 显著高于10mg/l ( $80 \pm 11\%$ ) ( $p < 0.05$ )，但在等于或大于15mg/l的浓度之间不能确定功效的显著差异 ( $92 \pm 4\%$ ) ( $p > 0.4$ )。当宿主动物用20mg/l处理时寄生虫清除率为  $92 \pm 7\%$ 。总之，在所有测试浓度下，吡虫啉有效地从其宿主中除去了 *Lepeophtheirus salmonis*。

[0127] 2.3速率测定研究

[0128] 据观察，暴露于10mg/l吡虫啉的海虱与暴露于30mg/l的那些相比似乎需要更长的时间来从宿主脱落。

[0129] 为了定量浓度和生效时间之间的关系，将20只宿主动物随机分配至10或20mg/l吡虫啉的处理浓度（每种浓度10条鱼）。速率测定研究的逻辑学基本上与相对功效研究相同，不同之处在于，一旦出现完全寄生虫清除，将鱼从处理溶液中移出并实施安乐死，从而最小化程序下的时间和相关的福利问题。

[0130] -结果

[0131] 用10mg/l和20mg/l的吡虫啉处理导致从宿主的总寄生虫清除。在整个过程中密切监测实验动物，将总清除时间记录至最接近的分钟。该事件代表实验终点，此时取出动物并实施安乐死。使用存活分析来确定寄生虫清除的时间是否在10mg/l和20mg/l之间显著不同。图2直观地将速率表示为Kaplan-Meier图，并且Mantel-Cox（对数秩检验）确定它们之间没有显著差异 ( $p = 0.48, n = 10, t \leq 56$ 分钟)。结果表明，吡虫啉的浓度对寄生虫清除时间没有影响，并且对于两种浓度均估计约27.5分钟的50%致死时间 (LT50)。

[0132] 该研究确定15mg/l是测试范围内的最佳浓度；高于该浓度未观察到功效的统计学显著增加。另外，可以确定浓度和生效时间之间没有关系，即在10或20mg/l吡虫啉下在任何时间点 ( $\leq 56$ 分钟) 对于个体宿主的总寄生虫清除概率没有显著差异。

[0133] 2.4海虱恢复

[0134] 在相对功效研究的取样点（见2.2），许多寄生虫仍然附着至其宿主（其中20%暴露于10mg/l，8%暴露于15和20mg/l，和3%暴露于25mg/l）。

[0135] 来自相对功效和速率测定研究的吡虫啉暴露的寄生虫（在处理从其宿主手动除去的那些和在处理期间脱落的那些）被浸入清洁的海水中并观察恢复的迹象。

[0136] 在第一次观察时，暴露的个体被确定为死亡或仍然活跃。在那些仍然活跃的中，肌肉激发是不协调的、不受控制的和有限的。这些个体显然不能够执行其基本功能（附着于宿主和定向的运动），这表明在处理仍然附着至宿主的寄生虫可能随后脱落下来。

[0137] 在暴露后期间（长达6小时），在暴露于任何浓度的吡虫啉的任何寄生虫中没有发现明显的功能恢复迹象。

[0138] 实施例3-在活鱼舱船中处理海虱感染

[0139] 将待处理的三文鱼挤在标准水产养殖笼中，然后泵入活鱼舱船的充氧养鱼舱中，使每个养鱼舱中的鱼密度为每立方米水90或120千克。将预混合的吡虫啉加入到养鱼舱中至20ppm w/v的剂量。然后将鱼处理60分钟。在处理期结束时，将鱼从养鱼舱中泵出并排水以确保处理过的水返回到养鱼舱中。为此，将鱼通过格栅或分级棒，并用未经处理的海水冲洗，以从鱼的外部除去任何处理水残留物，随后使鱼返回海围栏。所有漂洗水在使用后保留。

[0140] 使水通过筛孔尺寸为约50 $\mu\text{m}$ 或约150 $\mu\text{m}$ 的网状过滤器以除去有机物质,包括垂死的海虱和死的海虱及其卵块袋。

[0141] 实施例4-在现场处理海虱的L.salmonis和鱼虱的种

[0142] 吡虫啉对养殖大西洋三文鱼上的L.salmonis和鱼虱的种感染的成虫前期和成虫期的有效性通过对接受吡虫啉处理的三文鱼进行处理前和处理后的海虱计数来研究。该试验在挪威的一个商业三文鱼养殖场进行。将三文鱼泵入活鱼舱船中并暴露于20ppm吡虫啉60分钟。三文鱼的平均重量为3.5千克,每围栏的三文鱼平均数量为180,000条。对每围栏30条鱼评估了L.salmonis和鱼虱的种,并记录了发现的每个L.salmonis生命阶段的数量。这在处理前24小时内和处理后24小时内进行。

[0143] 这些评估是在总共4个围栏的三文鱼上进行的。在处理之前,鱼被挤在围栏内以使它们能够被泵入活鱼舱船,这是进行预处理海虱评估的地方。通过从活鱼舱船上的流出管移出鱼来进行处理后海虱评估。

[0144] 在所有时间点,取出3条鱼并放入麻醉浴中。重复10次,直到评估了30条鱼。

[0145] 根据海虱生命周期状态,活性物质施用前或施用后在此试验中对于四个测试围栏中的每一个观察到的每条鱼的海虱数量列于表5中。所有鱼在整个处理过程中观察到没有所见到的不良行为。

[0146] 表5-处理前和处理后海虱计数

阶段	围栏 A		围栏 B		围栏 C		围栏 D	
	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后	处理前	处理后
Chalimus	1.2	0.5	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
雄性成虫前期	1.8	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
雌性成虫前期	1.9	0.0	1.1	0.0	0.4	0.0	0.6	0.0
雄性成虫	0.9	0.0	1.0	0.0	1.7	0.0	0.8	0.0
雌性成虫	2.0	0.0	0.8	0.0	1.0	0.0	0.8	0.0
妊娠的雌性	0.5	0.0	0.4	0.0	0.4	0.0	0.3	0.0
<b>总计</b>	<b>8.3</b>	<b>0.0</b>	<b>4.0</b>	<b>0.0</b>	<b>3.6</b>	<b>0.0</b>	<b>2.5</b>	<b>0.0</b>
<b>鱼虱</b>	<b>2.9</b>	<b>0.0</b>	<b>0.7</b>	<b>0.1</b>	<b>3.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.5</b>	<b>0.0</b>

[0147] 因此,吡虫啉处理在现场针对海虱的L.salmonis和鱼虱的种是有效的。

[0148] 实施例5-吡虫啉对海虱的作用的时间尺度

[0149] 为了确定吡虫啉的效果的时间尺度,从储存槽中取出成虫前期和成虫海虱感染的三文鱼并使用对头部的猛烈冲击来将其杀死。在0、20、50、100、200或500ppm吡虫啉的存在下将鱼悬浮在30升水中,观察海虱30-60分钟以监测它们是否以及何时离开它们的宿主。

[0150] 对于暴露于0ppm吡虫啉(阴性对照)的鱼,观察60分钟。除暴露于500ppm吡虫啉的单条鱼观察60分钟外,所有其他处理过的鱼观察30分钟。每个处理组测试三条鱼。

[0151] 记录对于虱子离开宿主的时间以及海虱的性别和阶段的观察结果。离开宿主的任何虱子立即被转移到干净的海水中。此外,在暴露期结束时留在宿主上的任何虱子从宿主除去并转移到干净的海水中。

[0152] 在暴露期结束后不久和约2小时均观察到虱子。

[0153] 雄性与雌性海虱的比例约为50:50。水温约为12 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0154] 保持在未处理的海水中的死鱼上的虱子在60分钟的观察期内没有离开宿主,并且一旦转移到培养皿中就表现出正常的运动。这些运动包括泳动和附肢的典型的受控制的运

动。

[0156] 施用吡虫啉后不久,观察到虱子发生两次明显的变化-首先,将甲壳的侧缘向内拉以使虱子呈驼背外观,并且通过这样做,将虱子的下侧抬离鱼,其次,受影响个体的腹部相对于鱼表面以约45°的角度升高。

[0157] 在离开宿主之前,虱子通常变得非常活跃,在鱼的表面上移动,通常以圆形图案进行。一旦它们离开鱼,它们就以宽螺旋的向下运动的方式运动,然后在测试槽底部变得不动。

[0158] 在暴露于20至200ppm吡虫啉的组中,约50%的虱子在前15分钟内离开宿主。在暴露于500ppm吡虫啉的鱼中,大约70%的虱子在前9分钟内离开宿主。剩余的虱子留在宿主上直到暴露期结束。在处理期间,宿主上的虱子经历了甲壳的侧向压缩,从而产生虱子的驼背外观。

[0159] 因此,大多数海虱在15分钟内离开了处理过的宿主。

[0160] 与雌性相比,雄性虱子似乎更有可能离开宿主。暴露于吡虫啉的虱子通常表现出运动性的完全丧失和附肢的快速抽搐。与雄性相比,雌性虱子显示出较少的附肢移动,但与雄性相比,确实显示出肠道的蠕动。

[0161] -离开寄主的虱子的观察(在干净的海水中)

[0162] 阴性对照-没有暴露于吡虫啉的虱子显示出从宿主中除去的虱子的典型行为。这包括主动泳动和肠道的蠕动。附肢的运动被认为是有条不紊和受控制的。虱子对物理刺激有反应,主动地离开。

[0163] 20ppm-在暴露于20mg/L吡虫啉的49只虱中,两只在暴露后(p.e.)30分钟被认为死亡。当用一组镊子接触时,虱子从培养皿的侧面掉下来,倒置并泳动了一小段距离。然而,泳动不稳定,并且似乎是由大部分附肢的过度运动引起的。剩下的虱子被认为是垂死的,其附肢(包括腿、第二上颌骨和主要触须)快速抽搐。在暴露于20ppm吡虫啉30分钟的雌性中注意到肠道蠕动。49只中有12只被认为是存活并且有反应的,在没有刺激的情况下主动泳动。没有暴露30分钟的虱子显示出恢复的迹象。

[0164] 50ppm-在暴露于50ppm吡虫啉的21只虱子中,4只被认为在30分钟时死亡。在剩余的虱子中注意到主要附肢的抽搐,除了在暴露30分钟的两只雌性成虫中注意到的蠕动。在p.e.2小时检查的14只虱子被认为是死的,没有检测到运动。两只个体的腿部抽搐,四只雌性成虫表现出肠道的蠕动。

[0165] 100ppm-在暴露于100ppm吡虫啉的28只虱子中,4只在暴露期结束时被认为死亡。虱子通常显示次级触须和第二上颌骨的抽搐。另外11只虱子表现出肠道的蠕动。在许多个体中注意到甲壳的侧向压缩。在p.e.2小时28只虱子中的17只被认为死了。在p.e.2小时在28只虱子中的9只中注意到肠的蠕动运动;所有的都是雌性成虫。最后,一只虱子的触须和另一只虱子的第4条腿在p.e.2小时显示出有限的抽搐运动。

[0166] 200ppm-在暴露于200ppm吡虫啉的26只虱子中,4只在暴露期结束时被认为死亡。剩余的虱子通常是静止的,除了次级触须的抽搐,并且在四只雌性成虫虱子中注意到肠道的蠕动。在p.e.30分钟时注意到一只虱子的肛门抽搐。暴露后2小时六只虱子被认为死亡。此外,在剩余的动物中记录到有限的抽搐,主要包括3只雌性成虫的初级和次级触须的抽搐和肠道的蠕动。

[0167] 500ppm-在p.e.30分钟20只虱子中的6只被认为死亡。其中,两只在2小时后被记录为显示肠道蠕动或轻微抽搐。在p.e.30分钟检查的剩下的虱子典型的是第一和第二触须的快速抽搐,以及4只个体中颚肢的一些抽搐和肠道蠕动。在p.e.2小时,20只虱子中的15只被认为死亡。三只虱子显示次级触须的抽搐,并且在两只虱子中记录到肠道蠕动。

[0168] 实施例6-在分离的海虱上与甲基吡噁磷和溴氰菊酯的比较

[0169] 进行了一项试验,以确保对甲基吡噁磷和溴氰菊酯具有抗性的海虱与新烟碱类化合物之间没有交叉耐药性。使用两种性别的成虫前和成虫阶段(活动阶段)并且将它们群体中平均分配。在1升泡浴中将海虱暴露于一定浓度范围下的吡虫啉60分钟、甲基吡噁磷60分钟和溴氰菊酯30分钟(表6、7和8)。处理后将海虱转移到清洁的充气海水中。实验期间海水的温度为12℃,但在暴露期间在暴露60分钟(吡虫啉和甲基吡噁磷)的方案中温度升高至约14℃和在暴露30分钟(溴氰菊酯)的方案中温度升高至13℃。

[0170] 在暴露结束后约20小时记录每种方案中活的和不动的(包括杀死的)虱子的数量。每个虱子都被单独研究。

[0171] 吡虫啉、甲基吡噁磷和溴氰菊酯在该体外试验中的比例效应示于表6、7和8中。

[0172] 表6-吡虫啉对海虱的效应

	剂量(ppm)	活的	不动的	%效应
	0	9	0	0
	0	11	0	0
	5	7	3	30
	5	7	3	30
	10	5	5	50
[0173]	10	6	4	40
	15	0	10	100
	15	0	10	100
	20	0	10	100
	20	0	10	100
	30	0	10	100
	30	0	10	100

[0174] 表7-甲基吡噁磷对海虱的效应

剂量(ppm)	活的	不动的	%效应
0	11	0	0
0	11	0	0
5	10	0	0
5	10	0	0
10	9	1	10
[0175] 10	9	1	10
15	10	0	0
15	10	0	0
20	9	1	10
20	8	2	20
30	9	1	10
30	6	4	40

[0176] 表8-溴氰菊酯对海虱的效应

剂量(ppm)	活的	不动的	%效应
0	10	0	0
0	11	0	0
5	10	0	0
5	10	0	0
10	10	0	0
[0177] 10	9	2	18.2
15	8	2	20
15	9	1	10
20	8	2	20
20	9	1	10
30	10	1	9.1
30	8	2	20

[0178] 吡虫啉的估计EC<sub>50</sub>值为7.6ppm,吡虫啉的估计EC<sub>90</sub>值为14.4ppm。未计算甲基吡啶磷和溴氰菊酯的EC<sub>50</sub>和EC<sub>90</sub>值。

[0179] 实施例7-体内吡虫啉处理的浓度和时间依赖性

[0180] 为了确定体内吡虫啉处理的浓度和时间依赖性,在12°C下用在海水(32.5‰盐度)中的吡虫啉攻击大西洋三文鱼(平均320.9g)。降低槽中的水位并在施用活性物质期间采用通气。对三文鱼虱子桡足类幼体培养物进行计数并调整以在每个攻击时间点在攻击槽中获得每条鱼约40只桡足类幼体的目标水平。

[0181] 用标准方法计数鱼上的三文鱼虱子。仅研究了鱼的外表面(不包括鳃和口腔/颊腔)上的虱子。

[0182] 记录槽水中或附着在槽壁上的分离的虱子的数量。在处理后立即和在30-60分钟后再次收集槽水中的虱子并评估通过抽吸附着到光滑的塑料表面上的能力(以评估可能的恢复)。还从模拟处理的对照组中收集活的和有活力的虱子用于参考并且在恢复室中保持相同的时间段以评估系统。

[0183] 在每次测试期间体内评估鱼的行为/外观。记录行为和/或外观的任何变化,包括死亡率。试验中没有鱼死亡,并且没有进行尸检。

[0184] 制备活性物质的测试溶液(加入海水并均化)并施用至40升的处理体积。

[0185] 随机收集来自储存槽的三条被海虱感染的鱼并小心地引导到一个桶中从而形成内隔室(直径=34.5-40厘米;高=54厘米),其被浸没在槽中并且其中基座已被更换为具有9mm<sup>2</sup>方孔的塑料网筛。

[0186] 在每次测试开始后3分钟内将鱼转移到内隔室。在处理期间将内隔室悬挂/浸没在储存槽中。通过排干具有鱼的内隔室并将其转移到含有测试溶液的桶中来实施处理和模拟处理。处理/模拟处理在具有通气/充氧的静水中进行。调节通气以将氧饱和度设定为70-100%。

[0187] 为了终止处理,将具有处理过的鱼的内隔室提升到表面并排干,然后将鱼在没有水的情况下直接转移到具有致死的过量剂量的麻醉剂的第二个盆中并且保持直到死亡。记录麻醉浴中留在这些鱼上的所有虱子和掉落的虱子。

[0188] 处理浴中的剩余虱子通过悬浮在具有清洁海水的水浴中的浮游生物网(2mm孔径)过滤。将该收集器中的虱子转移到塑料烧杯(1升)中,然后再转移到恢复管(直径5cm;长10cm)中。在每次测试完成后3分钟内能够附着到处理槽或烧杯的壁上的虱子被评为存活。在恢复管中监测未附着在壁上的虱子30-60分钟。在30-60分钟后似乎在恢复管中存活的虱子和没有存活的那些在分开的类别中评分。

[0189] 模拟处理对照以类似方式进行。

[0190] 每条鱼在处理前具有平均每条鱼11只虱子。吡虫啉的暴露时间为3-60分钟,并且剂量范围为20ppm至200ppm。

[0191] 试验中没有鱼死亡。

[0192] 表9显示通过吡虫啉处理从鱼除去的虱子百分比。

[0193] 表9-用吡虫啉进行浴处理的结果

剂量 (ppm)	处理持续时间(分钟)				
	3	5	15	30	60
0(对照)	0 <sup>24</sup> /0 <sup>16</sup>	-	-	-	0 <sup>18</sup> /7.3 <sup>23</sup>
[0194] 20	-	-	-	63.9 <sup>36</sup>	74.1 <sup>27</sup>
50	-	-	-	91.3 <sup>23</sup>	-
100	7.0 <sup>43</sup>	-	73.7 <sup>38</sup>	-	-
200	-	55.9 <sup>34</sup>	91.5 <sup>47</sup>	-	-

[0195] 表9显示了处理后从鱼除去的虱子相对于虱子的总数的百分比。重复3分钟和60分钟的阴性对照组。上标数字表示每次测试中3条鱼上的虱子总数。

[0196] 因此,使用处理的时间段吡虫啉有效除去虱子。

[0197] 表10显示了通过处理从鱼中分离的海虱的百分比,以及在处理期间保持附着但随后收集的海虱的百分比,其在处理后30-60分钟保持活性。

[0198] 表10-海虱的恢复率

测试方案	在处理后 30-60 分钟时活跃的虱子的%			
	从槽水中收集的分离的虱子		从鱼收集的附着的虱子	
	n 只虱子	活跃%	n 只虱子	活跃%
对照 3 min	0	NA	0	NA
对照 3 min	0	NA	26	7.7
对照 60 min	0	NA	0	NA
对照 60 min	3	0.0	16	50.0
吡虫啉 20 ppm 30 min	23	4.3	9	11.1
吡虫啉 20 ppm 60 min	20	0.0	0	NA
吡虫啉 50 ppm 30 min	31	0.0	0	NA
吡虫啉 100 ppm 3 min	3	33.3	0	NA
吡虫啉 100 ppm 15 min	28	0.0	0	NA
吡虫啉 200 ppm 5 min	13	0.0	13	0.0
吡虫啉 200 ppm 15 min	43	0.0	0	NA

[0199] 因此,海虱通过变得分离而对吡虫啉起反应。一些经处理的海虱似乎仍然存活。使用处理水的过滤除去潜在存活的分离(和死亡)的海虱。

[0200] 作为比较,按照推荐的剂量方案,用0.1mg/1的甲基吡啶磷和0.2 $\mu$ l/1的溴氰菊酯对相同来源的海虱感染的鱼处理30分钟。处理在与用吡虫啉处理的条件相似的条件下进行。还施用了模拟处理对照。每种处理条件一式两份施用。该比较研究的结果如表11所示。

[0201] 表11-用甲基吡啶磷和溴氰菊酯进行浴处理的结果

化合物	除去%
对照1	0 <sup>29</sup>
对照2	0 <sup>42</sup>
溴氰菊酯1	0 <sup>37</sup>
溴氰菊酯2	0 <sup>37</sup>
甲基吡啶磷1	3.8 <sup>52</sup>
甲基吡啶磷2	3.0 <sup>33</sup>

[0202] 表11显示了处理后从鱼除去的虱子相对于虱子的总数的百分比。上标数字表示每次测试中3条鱼上的虱子总数。

[0203] 因此,响应于溴氰菊酯或甲基吡啶磷,海虱基本上保持附着于鱼,与吡虫啉所见的效果(其中海虱与鱼分离)相反。

[0204] 实施例8-吡虫啉的安全性

[0205] 评估了吡虫啉处理对鱼的安全性。将保持在含有271.8L海水的流通槽中的鱼暴露于65ppm w/v的活性成分吡虫啉。将17.67g吡虫啉溶于100ml二甲基亚砜(DMSO)中,并将该溶液加入至约900ml海水中并混合。停止通槽上的流动并添加吡虫啉溶液。

[0208] 将鱼在静态水中暴露于65ppm吡虫啉1小时,并以5-10分钟的间隔观察行为变化。然后将鱼再保持7天,然后终止测试。在暴露期间没有发现鱼行为的可观察到的变化。监测鱼持续另外7天,没有发现不良反应。终止时,未发现外部病症。

#### [0209] 实施例9—一系列新烟碱类化合物作用的比较

[0210] 在约233克的18个月大的大西洋三文鱼中,研究了海虱*Lepeophtheirus salmonis*的移动若虫暴露于约20ppm的四种新的新烟碱类化合物不同时间的过程中或其结果的处理后24小时的击倒时间和后续反应性/死亡率。在研究开始时,鱼没有显示出明显的健康问题。

[0211] 在攻击之前,使鱼适应环境,直到恢复正常的摄食行为,最多10天。将鱼放养在750升的槽中,放养密度不超过35千克/立方米。在4.8-10.4℃的温度下,以大于5L/min的流量给槽连续供应海水。光照周期设定为12小时光照:12小时黑暗。

#### [0212] 攻击模型

[0213] 在静水浴中,用目标滴度为每槽1,250-1,700个桡足类幼体的刚从雌性虱子成虫取出的具有卵块袋外观的*Lepeophtheirus salmonis*的桡足类幼体若虫攻击鱼

#### [0214] 准备攻击材料

[0215] 从妊娠的海虱收获卵块袋并在上升流室中培养直至无节幼体孵化。使无节幼体蜕皮至桡足类幼体若虫(在约10℃下5天),然后使槽的水通过100μm的筛网过滤,然后将桡足类幼体重悬于225mL海水中。取出25mL样品,然后在24孔板中分成1-2mL的样品,并且在立体显微镜下对无节幼体/桡足类幼体进行计数。当丰度足够并且最少80%的是桡足类幼体时,在黑暗中在静水流下攻击鱼8小时。

#### [0216] 选择并分配至处理组

[0217] 从槽中随机选择鱼,在仅足以诱导失去平衡的90ppm MS222溶液中轻轻镇静,然后通过头部不可恢复的冲击来将其杀死。每个处理需要4至33条鱼。

[0218] 然后将宰杀的鱼悬浮于处理槽中。将鱼从扎线带水平悬浮于槽中(一根穿过鳃盖腔,一根围绕柄(peduncle)),并线接至木杆。一个20L的槽每天使用20ppm的测试项目。宰杀的鱼上的虱子暴露5、10、15、30或60分钟(阴性对照仅暴露60分钟,因为这会覆盖待测试的最长暴露时间)。处理内的顺序是随机的。

#### [0219] 处理评估

[0220] 在暴露持续期间连续监测虱子并记录行为观察,包括虱子从鱼上脱落。在暴露结束时,或从槽或鱼取出虱子,放入小的通风塑料螺旋盖的容器(125mL,LDPE,在盖子上钻出25mm的孔并用200μm的筛网固定),并转移到供应有过滤的海水的干净的槽中,并在那儿呆24小时。使已经从鱼上脱落的虱子与没有从鱼上脱落的虱子保持分开。

#### [0221] 处理后评估

[0222] 处理后24小时,将虱子从螺旋盖的容器中取出,检查它们是否还存活,并且如果它们存活,它们是否有反应的。分类定义如下:存活——检测到移动;有反应的——存活且以协调的方式主动避开刺激;死亡——未检测到移动。

[0223] 被定义为有反应的虱子可能会再附着至鱼。评估后,将虱子转移到70%的醇中,以防需要确定若虫和性别。

#### [0224] 对照和测试外寄生虫处理

[0225] 对照处理是海水。测试的外寄生虫处理如下：新烟碱类化合物：吡虫啉、呋虫胺、烯啶虫胺、噻虫胺和噻虫嗪（均获自Sigma Aldrich, Dorset, UK）。

[0226] 在暴露当天，将200mg测试外寄生虫处理添加到1L海水中。仅供应了192mg的烯啶虫胺。使用磁力搅拌器和磁力搅拌子（VWR），以足以产生强涡旋的速度将溶液机械搅拌30分钟，以确保溶液均匀。然后，将其转移到约25L透明塑料槽，内装9L海水。然后使用小型泵（Fluval Sea CP1）将溶液再混合10分钟，然后从槽中取出，之后添加至鱼。除浓度为19ppm的烯啶虫胺之外，所有测试外寄生虫处理的终浓度为20ppm。

[0227] 结果

[0228] -处理结果

[0229] 每个处理需要每个重复每个单个处理1至4条鱼，每个重复每组2至13条鱼。阴性对照（海水）、呋虫胺、噻虫胺和噻虫嗪的处理重复2次，而吡虫啉的处理重复3次。每个烯啶虫胺的处理仅有一个重复。每个单个处理所使用的虱子的平均数是5.5至10，每组平均为6.2–7.2个虱子。

[0230] 观察到吡虫啉（60分钟时92.9%）、呋虫胺（60分钟时53.3%）和噻虫胺（30分钟时69.2%）的处理的击倒效果（表12）。海水和噻虫嗪组没有观察到击倒。

[0231] 表12-从鱼上掉下的海虱的比例

暴露时间(min)	海水	吡虫啉	呋虫胺	烯啶虫胺	噻虫胺	噻虫嗪
5	N/A	0	0	0	0	0
10	N/A	20.0	0	0	0	0
15	N/A	42.9	0	16.7	9.1	0
30	N/A	41.2	7.7	0	69.2	0
60	0	92.9	53.3	14.3	54.5	0

[0233] 表12显示了六个处理在处理阶段结束时从得到处理的鱼身上掉下的海虱百分比。“N/A”表示未测试。

[0234] 有两个虱子确实从暴露于烯啶虫胺的鱼身上掉下来，但经检查发现，虱子受到了物理破坏（可能是在鱼被杀死时），这可能是造成击倒的原因，而不是烯啶虫胺。

[0235] 在吡虫啉和噻虫胺处理中，击倒时间等于暴露时间的虱子的百分比与暴露时间负相关（图3）。在处理过程中，注意到暴露于吡虫啉的虱子在从鱼上脱落之前是有活性的。发现暴露于噻虫胺的虱子相对没有活性。这似乎反映在其击倒时间与暴露时间相同的虱子的百分比中（表13和14）。

[0236] 表13-击倒持续时间

暴露时间(min)	海水	吡虫啉	呋虫胺	烯啶虫胺	噻虫胺	噻虫嗪
5	N/A					
10	N/A	481 ± 60				
15	N/A	586 ± 114	900*	900*	900*	
30	N/A	1029 ± 165	1800*		1706 ± 71	
60		1209 ± 235	3109 ± 224	3600*	2289 ± 424	

[0238] 表13显示了在五个剂量时间下进行的六个处理的击倒时间（秒，平均值 ± SEM）。“N/A”表示未测试；空白表示没有虱子被击倒；\*表示只有一只虱子被击倒。

[0239] 表14-击倒持续时间等于暴露持续时间的海虱比例

暴露时间(min)	海水	吡虫啉	呋虫胺	烯啶虫胺	噻虫胺	噻虫嗪
5	N/A					
[0240] 10	N/A	33.3				
15	N/A	28.6	100*	100*	100*	
30	N/A	11.1	100*		77.8	
60		7.7	25	100*	33.3	

[0241] 表14显示了其击倒时间等于暴露时间的虱子的百分比。N/A表示未测试；空白表示没有虱子被击倒；\*表示只有一只虱子被击倒。

[0242] -处理后结果

[0243] (i) 暴露结束时仍在鱼上的虱子

[0244] 用海水处理过的所有虱子都具有反应性(表15)。用吡虫啉处理的海虱的反应性从15分钟开始逐渐受到影响,在60分钟的处理中没有虱子是有反应的。暴露于呋虫胺的虱子显示出反应性降低,除了在10分钟的暴露时不受影响。噻虫胺会在暴露10、15和30分钟时影响虱子的反应性,而在5和60分钟时则不会。这可能是由于重复少而造成的假象。暴露于噻虫嗪的虱子在60分钟内会稍微受到影响(由于仅一个虱子),而暴露于烯啶虫胺的虱子在所有暴露时间内均不受影响。

[0245] 表15-从鱼回收的虱子的反应性

暴露时间(min)	海水	吡虫啉	呋虫胺	烯啶虫胺	噻虫胺	噻虫嗪
5	N/A	100	73	100	100	100
[0246] 10	N/A	100	100	100	93	100
15	N/A	45	69	100	90	100
30	N/A	50	83	100	75	100
60	100	0	88	100	100	92

[0247] 表15显示了在处理期结束时从鱼中回收的海虱的反应性百分比。

[0248] (ii) 暴露结束时虱子被清除的鱼

[0249] 在吡虫啉、呋虫胺、烯啶虫胺和噻虫胺组中观察到了击倒(表16)。这在阳性对照组中最为明显,其中从暴露10分钟开始就出现了击倒。随着暴露时间的增加,反应性逐渐丧失。60分钟暴露未发现虱子有反应。在呋虫胺组中分别在15分钟和30分钟时观察到100%和0%的反应性,这是由于一只虱子没有反应性。由于在这些暴露时间中每次只有一个虱子脱落,因此应谨慎对待这一结果。在烯啶虫胺处理中,两个虱子均受到了物理破坏并死亡。这种破坏很可能是在三文鱼被杀死过程中发生的。暴露15、30和60分钟时,噻虫胺的反应性分别为0%、44%和33%。暴露15分钟时0%的反应性是由于一只虱子没有反应性。

[0250] 表16-从鱼回收的虱子的反应性

	暴露时间(min)	海水	吡虫啉	呋虫胺	烯啶虫胺	噻虫胺	噻虫嗪
[0251]	5	N/A					
	10	N/A	100				
	15	N/A	33	100	0	0	
	30	N/A	10	0		44	
	60		0	71	0	33	

[0252] 表16显示了在处理24小时后在处理结束时从槽中回收的虱子的反应性百分比。如果数据表中没有条目,则表明没有虱子脱落。

[0253] 当一起检查所有虱子的反应性时,在海水处理组中发现了反应性的逐渐丧失,而在噻虫胺组中则或多或少地观察到了反应性的丧失(图4)。在呋虫胺组中没有观察到相对于暴露时间的明显效果。

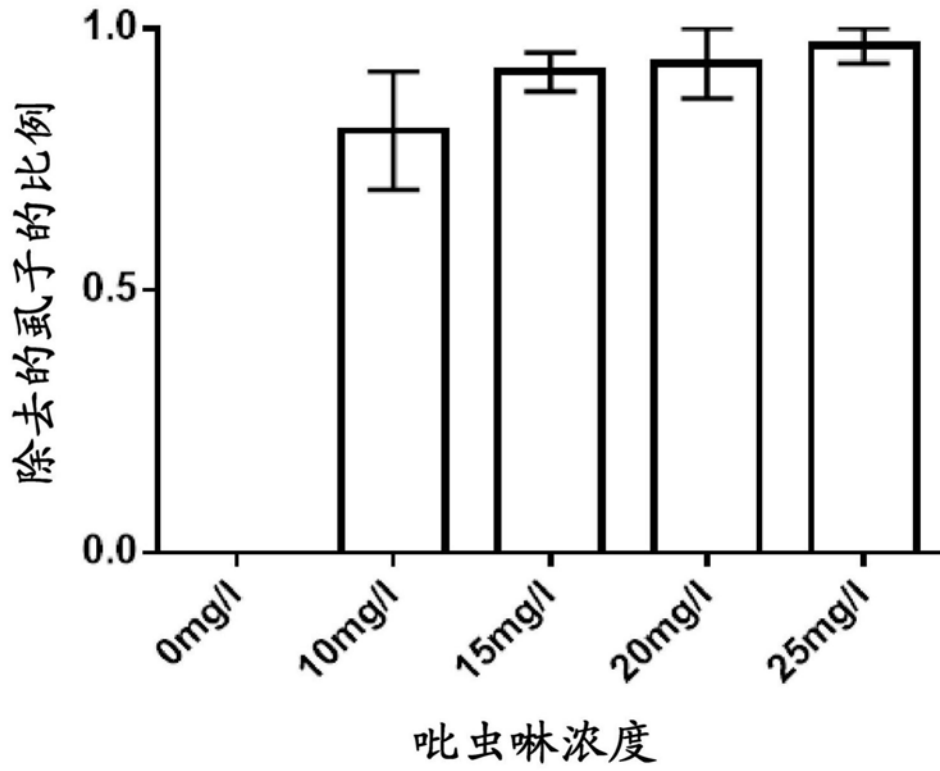


图1

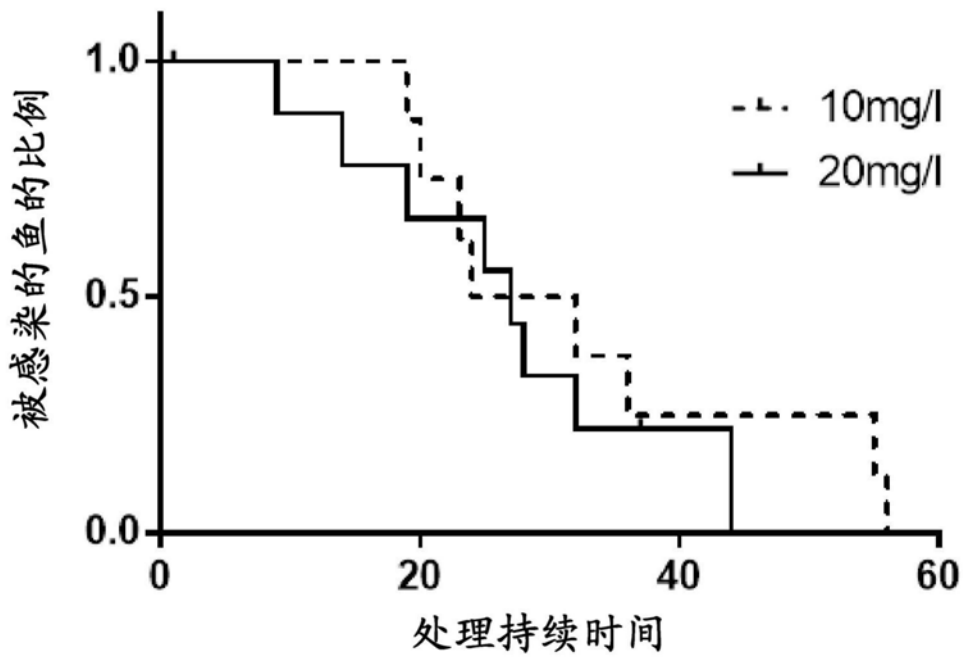


图2

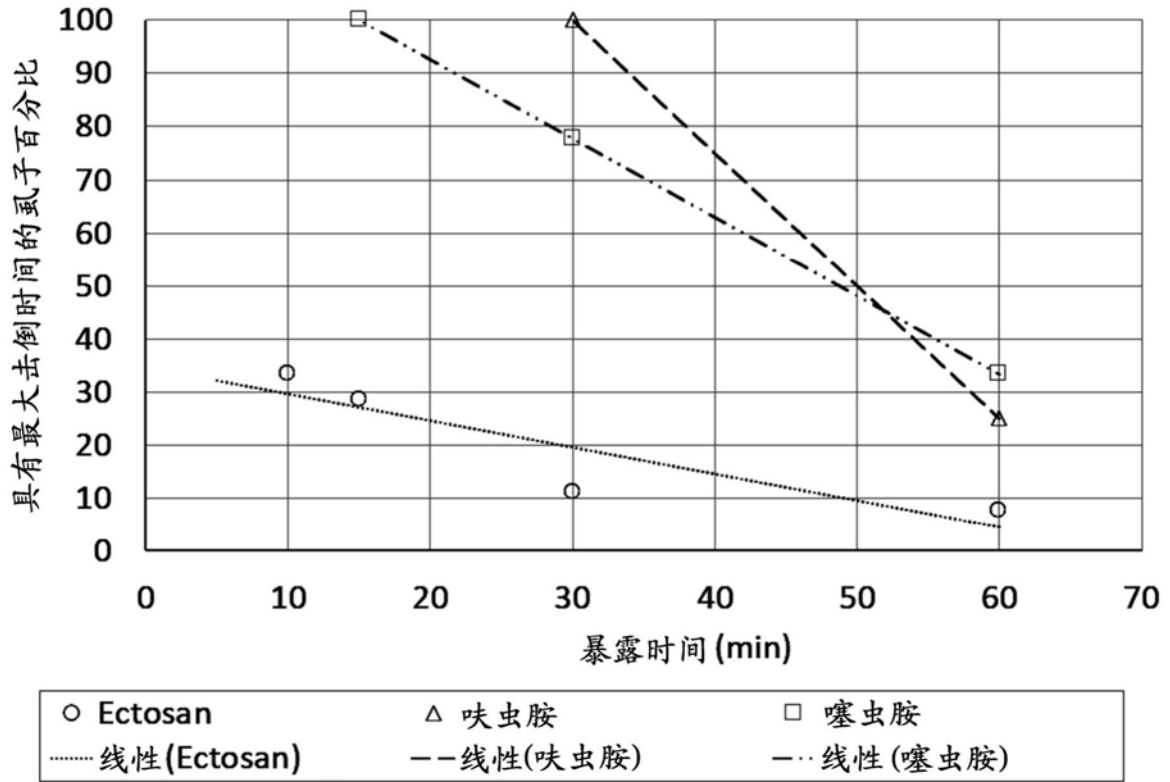


图3

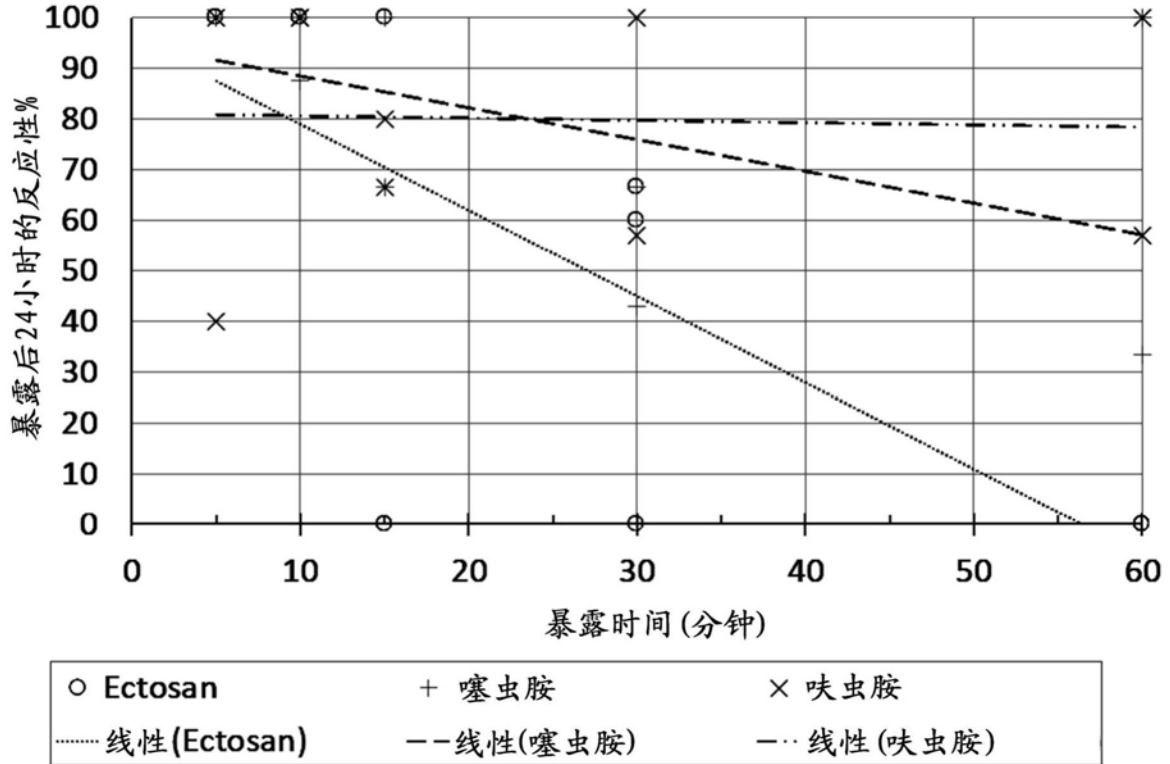


图4