

**ПРЕПАРАТ «ДИПЛОЦИД» ДЛЯ БОРЬБЫ ПРОТИВ
ДИПЛОСТОМОЗОВ РЫБ**

А.В. Беспалый, С.М. Дегтярик, Р.Л. Асадчая, Э.К. Скурат, Е.И. Гребнева, Н.А. Бенецкая, Т.А. Говор, А.Н. Лемеза

РУП «Институт рыбного хозяйства», 22, ул. Стебенева, 220024, г. Минск, Беларусь, belniirh@tut.by

**MEDICATION «DIPLOCIDUM» FOR PROPHYLAXIS AND
TREATMENT FOR DIPLOSTOMOSE OF FISH**

A.V. Biaspaly, S.M. Degtjaryk, R.L. Asadchaya, E.K. Skurat, E.I. Grebneva, N.A. Benetskaja, T.A. Govor, A.N. Lemeza

*RUE «Fish Industry Institute»,
Stebeneva str., 22, Minsk, 220 024, Belarus, belniirh@tut.by*

Реферат. Создан препарат «Диплоцид» для профилактики и лечения диплостомозов рыб. Эффективность препарата против указанных заболеваний подтверждена испытаниями в производственных условиях. Гибель возбудителей заболевания - метацеркарий трематод р. *Diplostomum* в результате применения препарата достигала 100 %. Разработана нормативная документация для применения препарата Диплоцид в рыбоводческих хозяйствах.

Ключевые слова: диплостомы, диплостомозы рыб, паразиты рыб, антгельминтики, диплоцид.

Abstract. There has been produced the medicinal product Diplocide for prevention and treatment of fish diplostomozes. The efficiency of the medicinal product against the said diseases was confirmed by the tests and in industrial conditions. Death of pathogenic agents metacercaria p. *Diplostomum* at the result of medicinal product application attained 100%. There was elaborated regulation documentation application of the medicinal product Diplocidew in fish breeding farms.

Key words: diplostomes, fish diplostomozes, fish parasites, anthelminthics, diplocide.

Введение

Перед рыбной отраслью Республики Беларусь в настоящее время стоит задача - увеличить производство товарной рыбы и довести его объем до уровня, удовлетворяющего необходимую потребность населения в этом продукте.

Успешное использование водоемов рыбоводных хозяйств, а также озер и водохранилищ для разведения ценных и промысловых рыб связано с решением ряда проблем, важнейшей из которых является защита выращиваемых рыб от болезней [1].

Такие паразитарные заболевания, как диплостомозы рыб, вызываемые личинками (церкариями и метацеркариями) трематод р. *Diplostomum*, до настоящего времени остаются одной из насущных проблем рыбоводной отрасли как нашей страны, так и стран ближнего и дальнего зарубежья. Патогенность паразитирующих в рыбах личинок диплостом никогда не подвергалась сомнению.

Достоверно известно, что к данному заболеванию восприимчивы более 120 видов (практически все виды пресноводных и проходных) рыб. К наиболее восприимчивым можно отнести в первую очередь большинство видов карповых рыб, а также лососевых, сиговых, осетровых. Носительство паразитов может регистрироваться у окуня, судака, налима, щуки.

Заболевание протекает в 2-х формах: острая (церкариозный диплостомоз) и хроническая (паразитарная катаракта). При острой форме могут поражаться все органы и ткани рыбы, через которые проходит миграция личинок-церкарий; нередко процесс сопровождается массовой гибелью. При хронической форме наблюдается частичное или полное помутнение хрусталика (паразитарная катаракта), может произойти разрыв капсулы хрусталика. У слепой рыбы снижается темп роста, нарушаются обменные процессы, она становится легкой добычей хищников [2,3,4, 5].

Методы терапии данного заболевания у нас в республике до настоящего времени отсутствовали. Борьба против диплостомозов сводилась к отпугиванию и снижению численности рыбацких птиц (дефинитивных хозяев паразитов), а также уничтожению моллюсков (первых промежуточных хозяев) путем внесения моллюскоцидов. Однако особенности большинства прудовых хозяйств и, тем более, арендуемых водоемов не позволяют осуществлять указанные мероприятия. Поэтому разработка и внедрение средств защиты

прудовых рыб от диплостомозов является перспективным направлением ихтиопатологической науки.

Материалы и методы

Лабораторные опыты. Объектом изучения служила рыба различных видов общим количеством 1241 экз. (сеголеток пестрого толстолобика – 33 экз., годовик пестрого толстолобика – 80 экз., сеголеток белого амура – 483 экз., годовик белого амура – 280 экз., годовик карася серебряного – 80 экз., годовик карпа – 105 экз., годовик ленского осетра – 90 экз., годовик радужной форели – 90 экз.), а также моллюски *Lymnaea stagnalis* (прудовик большой) – 436 экз. В каждом варианте опыта и контроля было использовано от 10 до 30 экз. рыбы. Контролем служили аквариумы, где рыба не была прокормлена либо обработана препаратом.

Паразитоцидную активность различных субстанций при поиске активноедействующего вещества (АДВ) будущего препарата, а также эффективность готового препарата изучали *in vitro* и *in vivo*.

В первом случае в чашки Петри с водопроводной водой помещали хрусталики и стекловидные тела, извлеченные из глаз рыб, зараженных метацеркариями *Diplostomum* sp. Из неповрежденных хрусталиков метацеркарии выходят в воду за 3-5 часов, из поврежденных (надрезанных) – за 30 - 40 мин [2, 5, 6]. В свободноплавающем состоянии личинки трематод остаются живыми около суток. Плавающих в воде метацеркарий обрабатывали растворами исследуемых субстанций либо готового препарата в определенных концентрациях, подсчитывали процент гибели по сравнению с контролем (чашки, в которых обработку не проводили).

Во втором случае исследуемые препараты задавали рыбе *per os* в различных дозах. После 2 - 10 суток наблюдения рыбу вскрывали, проводили компрессионную микроскопию хрусталиков и стекловидного тела глаз с целью определения воздействия препаратов на метацеркарии трематод р. *Diplostomum* непосредственно в организме рыбы-хозяина.

Для отработки способов и доз применения препарата «Диплоцид» и определения его токсичности для рыб препарат вводили в организм рыбы per os в различных дозах, а также применяли в виде ванн различной экспозиции и концентрации.

Изучение токсичности препарата проводили согласно «Методическим указаниям по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» [7].

Производственные испытания. Для проведения производственных испытаний было использовано: сеголетка карпа – 6500 кг, сеголетка белого амура – 6500 кг, двухгодовика белого амура – 1000 кг, двухгодовика пестрого толстолобика – 100 кг, сеголетка стерляди – 80 кг, двухлетка стерляди – 65 кг, двухлетка ленского осетра – 679 кг, трехлетка ленского осетра – 120 кг. Контролем служили пруды либо бассейны, условия содержания рыбы в которых были аналогичны опытному, но без применения препарата.

Результаты исследований и обсуждение

Активность антигельминтных субстанций при диплостомозе и их токсичность для рыб

Так как фармакологические препараты для лечения диплостомозов рыб до недавнего времени в республике отсутствовали, создание такого препарата начинали практически с нуля, с поиска АДВ. Планировалась разработка эффективного, относительно дешевого препарата с перспективой производства его в Беларуси. С этой целью проводили изучение воздействия на метацеркарии диплостоматид ряда субстанций различной природы и спектра действия, служащих АДВ для ряда ветеринарных препаратов. Предварительно было отобрано 11 субстанций:

- | | |
|--|----------------------------|
| – празиквантел; | – левамизола гидрохлорид; |
| – триклабендазол; | – тетрализола гидрохлорид; |
| – клозантел натриевая соль; | – метронидазол порошок; |
| – фенбендазол-порошок; | – альбендазол; |
| – ампролиум гидрохлорид; | – мебендазол. |
| – ивермектим (содержит 1 % АДВ – ивермектина); | |

Их трематоцидную активность изучали *in vitro*, используя хрусталики глаз сеголетков белого амура (33 экз.) и пестрого толстолобика (33 экз.), зараженных метацеркариями трематод р. *Diplostomum* естественным путем. Экстенсивность инвазии (ЭИ) составила 100 %, интенсивность инвазии (ИИ) у белого амура – 2–12 пар./рыбу, у пестрого толстолобика – 2–17 пар./рыбу.

В результате проведенных экспериментов установлено, что наиболее выраженным трематоцидным действием на вышедших их хрусталиков глаз в воду метацеркарий трематод р. *Diplostomum* обладали празиквантел (через 30-40 минут наблюдалась 100%-я гибель гельминтов) и, как ни парадоксально, инсектицид ивермектим (100%-я гибель паразитов наблюдалась через 30 минут). Наблюдения за метацеркариями, находящимися под воздействием остальных препаратов, продолжалось в течение 5 часов. По истечении указанного промежутка времени констатирована гибель от 20 до 50 % личинок гельминтов. В контроле все паразиты были живы, подвижны и активны.

Токсичность перечисленных выше субстанций изучали на сеголетках белого амура общим количеством 450 экз. (по 10 экз. в каждом варианте опыта). Испытывали дозы 20, 50, 100, 150, 200, 300 мг АДВ на 1 кг живого веса рыбы (мг АДВ/кг). Для исследований брали только те вещества, трематоцидное действие которых по отношению к метацеркариям диплостоматид по завершении опытов *in vitro* не равнялось нулю (празиквантел, триклабендазол, клозантел натриевая соль, левамизол гидрохлорид, метронидазол порошок, ампролиум гидрохлорид, альбендазол, ивермектим). Препараты рыбе задавали *per os*. Наблюдение вели в течение 10 суток. Затем рыбу вскрывали, оценивали состояние внутренних органов и наличие в них патологических изменений. Параллельно проводили компрессионную микроскопию хрусталиков и стекловидного тела глаз с целью определения воздействия препаратов на метацеркарии трематод р. *Diplostomum* непосредственно в организме рыбы-хозяина (*in vivo*).

Полученные данные свидетельствуют о том, что большинство субстанций в исследованных дозах для рыб нетоксичными (волнения и гибели рыб не

отмечено, патологические изменения внутренних органов отсутствовали) либо слаботоксичными. Однако их трематоцидная активность по отношению к метацеркариям диплостоматид, локализованным в хрусталиках и стекловидном теле глаз рыб, оказалась либо незначительна, либо равна нулю. Исключение составили празиквантел и ивермектим.

Празиквантел. При его применении в минимальной дозе, 20 мг АДВ/кг наблюдалась 100%-я гибель личинок трематод. Благодаря этому, а также полному отсутствию токсичности для рыб это вещество было отмечено как наиболее перспективное для создания препарата для лечения диплостомозов.

Ивермектим. Даже в наименьшей из проверенных в первой серии опытов дозе (20 мг АДВ/кг) он вызывал 100%-ю гибель рыб. Дозу снизили сначала до 10, затем до 1,0 и до 0,1 мг АДВ/кг, но во всех случаях подопытные рыбы погибали в течение 0,5 – 12 часов. При этом трематоды в хрусталиках глаз оставались живы.

Таким образом, наиболее эффективным веществом для борьбы против диплостомозов рыб оказался празиквантел. На его основе был создан препарат, получивший в дальнейшем название «Диплоцид», содержащий в качестве АДВ указанное вещество.

Изучение токсичности препарата «Диплоцид» для рыб

Токсичность препарата «Диплоцид» для рыб изучали на представителях следующих видов: белый амур, пестрый толстолобик, карп, карась серебряный, радужная форель, ленский осетр. Было использовано по 80 экз. годовиков каждого вида рыб (по 60 – для определения острой токсичности, по 20 – для определения хронической токсичности).

Для определения острой токсичности взяты дозы, превышающие терапевтическую в 2,5 – 25 раз (50-500 мг АДВ/кг). В аквариумы помещали по 10 экз. рыб каждого вида в каждом варианте опыта и по 10 экз. для контроля (контрольная рыба получала воду без добавления препарата). Рыбу кормили однократно, после чего в течение 48 часов наблюдали за ее поведением и физиологическим состоянием. Препарат задавали в жидкой форме per os при

помощи катетера, предварительно разведя в кипяченой воде. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Острая токсичность препарата «Диплоцид» для рыб

Вид рыбы	Доза препарата, мг АДВ/кг					Контроль
	50	100	200	300	500	
Белый амур	0	0	0	0	0	0
Пестрый толстолобик	0	0	0	0	+	0
Карп	0	0	0	0	0	0
Карась серебряный	0	0	0	0	0	0
Форель радужная	0	0	0	+	++	0
Ленский осетр	0	0	0	0	0	0

Примечания:

0 – отсутствие токсического действия препарата: волнения, гибели, изменений внутренних органов не отмечено;

+ - непосредственно после кормления препаратом отмечено легкое волнение рыбы, прекратившееся через 3 мин.;

++ - отмечено волнение рыбы в течение более длительного времени (10-15 мин.).

Таким образом, препарат «Диплоцид» при применении в дозах, в 2,5 – 25 раз превышающих терапевтическую дозу, не является токсичным для рыб. Только у форели радужной и пестрого толстолобика наблюдалось небольшое волнение при применении в максимальных дозах 300-500 мг АДВ/кг. Гибели подопытных рыб не отмечено ни в одном из вариантов опыта.

При определении хронической токсичности Диплоцида рыбе (по 10 экз. годовиков каждого из перечисленных видов рыб в опыте и по 10 – в контроле) ежедневно в течение 10 дней задавали препарат в предполагаемой терапевтической дозе (20 мг АДВ/кг), затем на протяжении 30 дней вели наблюдение за ее поведением и физиологическим состоянием.

Отмечено, что Диплоцид не оказывал токсического воздействия на состояние подопытной рыбы. На протяжении и по прошествии 30 суток отклонений в поведении рыбы, а также четко выраженных патологических изменений кожных покровов, жаберного аппарата и внутренних органов

(плавательный пузырь, печень, почки, желчный пузырь, мышечная ткань) по сравнению с контролем не отмечено.

Применение препарата «Диплоцид» в виде лечебного корма

Для постановки экспериментов использовали годовиков белого амура, зараженных трематодами р. *Diplostomum* (ЭИ – 100 %, ИИ – 12–42 пар./рыбу). В опытный и контрольный аквариумы было посажено по 10 экз. рыб. Препарат «Диплоцид», разведенный в теплой воде, задавали подопытной рыбе per os при помощи катетера. Контрольные экземпляры рыб получали аналогичное количество чистой воды. Препарат задавали в дозах 5, 10, 20 и 50 мг АДВ/кг. Поскольку навеска использованной в опытах рыбы колебалась в достаточно широких пределах (17 – 39 г), для того, чтобы точно выдержать дозировку, каждую рыбу взвешивали и затем производили расчет количества вводимого ей жидкого препарата по следующим формулам:

– для дозы 50 мг АДВ/кг: $X = 0,025 A$;

– для дозы 20 мг АДВ/кг: $X = A / 50$;

– для дозы 10 мг АДВ/кг: $X = A / 100$;

– для дозы 5 мг АДВ/кг: $X = A / 200$,

где: X – количество жидкого препарата, мл,

A – индивидуальный вес рыбы, г.

За опытной рыбой вели наблюдение в течение 3 суток, затем производили ее вскрытие и компрессионную микроскопию хрусталиков и стекловидного тела глаз. При этом подсчитывали процентное соотношение живых и погибших метацеркарий диплостоматид. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Трематоцидная эффективность препарата «Диплоцид» при скармливании его в различных дозах

№	Доза препарата, мг АДВ/кг	Гибель трематод, %
1	5	40
2	10	85
3	20	98
4	50	100
К	X	0

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что препарат «Диплоцид», заданный годовикам белого амура в дозах 5 и 10 мг АДВ/кг не вызывает в достаточной мере гибели паразитов (погибло 40 и 85% гельминтов соответственно). Препарат в дозах 20 и 50 мг АДВ/кг вызывал практически полную гибель трематод (98-100 %), при этом доза 20 мг АДВ/кг практически не отличалась по действию от дозы 50 мг АДВ/кг.

Препарат в дозе 20 мг АДВ/кг задавали также годовикам карпа (25 экз.), форели радужной (10 экз.) и ленского осетра (10 экз.), зараженным метацеркариями трематод *Diplostomum* sp. Получены сходные результаты: препарат в дозе 20 мг АДВ/кг вызывал гибель 95–100 % трематод. Таким образом, Диплоцид в дозе 20 мг АДВ/кг может быть использован в дальнейшем для борьбы против диплостомозов рыб в составе лечебного корма.

Применение препарата «Диплоцид» в виде лечебных ванн.

Для постановки экспериментов использовали годовиков белого амура, зараженных метацеркариями трематод *Diplostomum* sp. (ЭИ – 100 %, ИИ – 7-69 пар./рыбу). В каждом варианте опыта и контроля было использовано по 30 экз. рыб. Так как препарат «Диплоцид» слабо растворяется в воде, перед применением необходимое его количество заливали небольшим объемом горячей (40–50° С) воды, тщательно перемешивая и растирая до образования молочно-белой жидкости. Затем вносили в воду, распределяя по всему объему. Препарат применяли в следующих дозах: 30 мг /л воды, 20 мг/л, 15 мг/л, 10 мг/л с экспозицией 60 мин. В контрольных аквариумах рыба из той же партии находилась в воде без добавления препарата. Через 2, 5 и 14 суток после обработки вскрывали по 10 экз. рыбы из каждого варианта опыта и контроля. Проводили компрессионную микроскопию глаз, подсчитывали живых и погибших паразитов. Результаты представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы, препарат в дозах 10-15 мг/л не вызывал 100 %-й гибели паразитов в глазах рыб; препарат в дозах 20-30 мг/л вызывал полную гибель трематод в течение 2–5 суток. В глазах контрольных рыб все трематоды были живы и подвижны.

Таблица 3 – Обработка рыбы препаратом «Диплоцид» методом лечебных ванн

Доза препарата, мг/л	Гибель трематод <i>Diplostomum</i> sp. после обработки рыбы Диплоцидом, %		
	2 суток	5 суток	14 суток
10	64	72	75
15	77	87	95
20	85	100	100
30	100	100	100
К	0	0	0

Считаем, что экономически целесообразно остановиться на дозе 20 мг/г. Таким образом, препарат можно рекомендовать к применению методом лечебных ванн из расчета 20 мг препарата на 1 л воды (20 г/м³), при экспозиции 60 мин.

Изучение влияния препарата «Диплоцид» на церкарий – свободноплавающие стадии трематод р. Diplostomum

Трематоды р. *Diplostomum* обладают сложным циклом развития со сменой хозяев. Дефинитивным хозяином трематод *Diplostomum* sp., как известно, являются рыбаодные птицы (разнообразные виды чайковых птиц, рыбаодные утки, серая цапля, кулики и др.). Первый промежуточный хозяин указанных трематод - моллюски (как правило, различные виды прудовиков), второй промежуточный хозяин – рыбы. Исходя из этого, борьба против диплостомозов рыб может осуществляться путем разрыва жизненного цикла возбудителя на стадии свободноплавающих церкарий.

С целью уничтожения церкарий трематод были испытаны различные дозы препарата «Диплоцид». Для этого в естественных экосистемах (оз. Нарочь, вдхр. «Вилейское») были собраны моллюски *Lymnaea stagnalis* (прудовик большой) в количестве 436 экз., из числа которых, в свою очередь, отобраны особи, зараженные трематодами р. *Diplostomum*. Для выявления зараженных особей каждого моллюска помещали в отдельную емкость с водой и по прошествии 1–2 часов просматривали воду под биноклем, отмечая при этом наличие церкарий диплостом. В результате было отобрано 32 экз. моллюсков.

Зараженных моллюсков помещали в стеклянные стаканы емкостью 1 л, наполненные водой, и добавляли препарат «Диплоцид» в дозах 20, 50 и 100 мкг/л, затем непрерывно наблюдали за поведением и состоянием церкарий паразита.

Начинали с дозы 20 мкг/л. Через 20 мин. были замечены первые отклонения в поведении церкарий; через 90 мин. многие церкарии стали малоподвижными, отдельные особи были абсолютно неподвижны; через 300 мин. (5 часов) подвижных особей практически не наблюдалось, около 50 % из них расчленились (отделились органы движения – «фурки»). По прошествии 20 часов после обработки препаратом в стаканах с моллюсками живых и подвижных церкарий не наблюдалось, на дне появился слой погибших паразитов. Наблюдения за моллюсками продолжали еще в течение 10 суток, при этом вновь вышедших живых церкарий в стаканах не отмечалось. Более того, когда моллюскам сменили воду, и они оказались в среде без добавления препарата, выяснилось, что они перестали продуцировать церкарии. Это может свидетельствовать о гибели промежуточных стадий трематод, паразитирующих в организме моллюсков.

Таким образом, при применении препарата «Диплоцид» происходит не только гибель свободноживущих стадий гельминтов р. *Diplostomum*, но и исцеление зараженных моллюсков. В это же время прудовики из контрольных групп (находящиеся в воде без добавления препарата) в течение всего времени наблюдения активно продуцировали живые, подвижные церкарии, хорошо заметные в толще воды даже невооруженным глазом.

Препарат в дозах 50 и 100 мкг/л действовал точно так же, только в несколько ускоренном темпе. Диплоцид испытали также в дозе 10 мкг/л; при этом он не вызывал 100 %-й гибели церкарий.

Таким образом, можно рекомендовать применение препарата «Диплоцид» для обработки рыбы в прудах в концентрации 20 мкг препарата на 1 л (20 мг/м³) с целью уничтожения свободноплавающих церкарий паразита. Обработка целесообразна преимущественно в прибрежной зоне, где

присутствуют макрофиты и др. водная растительность, т.е. в местах обитания моллюсков.

Производственные испытания препарата «Диплоцид» проводили на базе рыбопитомника «Черница» ГПУ НП «Браславские озера», ХРУ «Вилейка» и ОАО «ОРХ «Селец». Испытания показали, что препарат эффективен для лечения и профилактики диплостомозов у рыб при применении в виде лечебного гранулированного комбикорма, а также методом лечебных ванн.

Заключение

Из 11 субстанций, служащих АДВ для ветеринарных препаратов, экспериментальным путем был отобран празиквантел, показавший отсутствие токсичности для рыб и обладающий ярко выраженным трематоцидным действием. На его основе был создан препарат «Диплоцид», при применении которого погибает до 100 % трематод *Diplostomum* (как метацеркарий, паразитирующих в хрусталиках и стекловидном теле глаз рыбы, так и свободноплавающих церкарий, способных при проникновении в тело рыбы вызывать острый церкариоз).

Диплоцид можно применять для борьбы против диплостомозов рыб различными способами: в виде лечебного гранулированного комбикорма; методом лечебных ванн; путем обработка прудов, внося препарат непосредственно в воду прибрежной зоны. Препарат «Диплоцид» не обладает острой и хронической токсичностью для рыб как в терапевтической дозе, так и в дозах, превышающих ее в 2,5 – 25 раз. Диплоцид успешно прошел производственные испытания; разработаны и утверждены в установленном порядке нормативные документы на его производство и применение.

Список использованных источников:

1. Аквакультура осетровых рыб // Статьи [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://www.nft.by/index.php?-name=Pages&op=ca-t&id=3>. – Дата доступа: 01.07.2014.

2. Головина, Н.А. Ихтиопатология / Н.А. Головина [и др.]. – М.: Мир, 2003. – С. 314-319.

3. Соусь, С.М. Диплостомоз рыб в Чановском озерном хозяйстве/ С.М. Соусь// Современное состояние водных биоресурсов: Материалы 2-ой международной конференции. Новосибирск, 2010. – С. 280.

4 . Mitchell, C. G. Diplostomum Aquaculture Information/ C. G. Mitchell. – series № 17. – 1996. – 6 p.

5 Шигин, А.А. Трематоды фауны России и сопредельных регионов. Род *Diplostomum*. Метацеркарии/ А.А. Шигин. – М.: Наука, 1986. – 253 с.

6 Методические указания по определению возбудителей диплостомозов пресноводных рыб, утв. Минсельхозпродом РФ 22.09.98. – М., 1998. – 4 с.

7 Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве: Утв. Гл. упр. вет. 23.08.88 / М-во сельхозпрода СССР. – М., 1988. – С. 18.