



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 043 714** (13) **C1**
(51) МПК⁶ **A 01 K 61/00**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **93048350/13**, **22.10.1993**

(46) Опубликовано: **20.09.1995**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Eaton W.O. Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic: cytidylic acid** Diseases of Aquatic Organisms. 1990, vol. 9, p.193-198.

(71) Заявитель(и):

Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства, Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ Научно-производственного объединения "Вектор"

(72) Автор(ы):

**Щелкунов И.С.,
Аликин Ю.С.,
Щелкунова Т.И.,
Купинская О.А.**

(73) Патентообладатель(ли):

Всероссийский научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства, Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ Научно-производственного объединения "Вектор"

(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ

(57) Реферат:

Назначение в рыбоводстве для профилактики вирусных заболеваний рыб. Сущность изобретения: рыб обрабатывают иммуномодулятором путем инъекций или выдерживания в растворе препарата. В качестве иммуномодулятора используют индуктор интерферона на основе двуспиральной РНК природного происхождения. Рыб инъецируют дозой 1-20 мг/кг массы тела, а выдерживание осуществляют в растворе препарата с

концентрацией 0,5 - 2 мг/л в течение 30-60 мин с использованием метода гиперосматической инфильтрации при насыщении воды кислородом до 80-100%. Гиперосматическую инфильтрацию осуществляют путем предварительного выдерживания рыб в течение 1-2 мин в 5-6% растворе хлористого натрия. Изобретение направлено на создание высокоэффективного экологически чистого, недорогого, технологичного и универсального способа профилактики рыб. 1 з.п. ф-лы, 3 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 043 714** (13) **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 01 K 61/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **93048350/13, 22.10.1993**

(46) Date of publication: **20.09.1995**

(71) Applicant(s):

**Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut prudovogo rybnogo khozjajstva,
Nauchno-issledovatel'skij konstruktorsko-
tehnologicheskij institut biologicheski
aktivnykh veshchestv Nauchno-
proizvodstvennogo ob"edinenija "Vektor"**

(72) Inventor(s):

**Shchelkunov I.S.,
Alikin Ju.S.,
Shchelkunova T.I.,
Kupinskaja O.A.**

(73) Proprietor(s):

**Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij
institut prudovogo rybnogo khozjajstva,
Nauchno-issledovatel'skij konstruktorsko-
tehnologicheskij institut biologicheski
aktivnykh veshchestv Nauchno-
proizvodstvennogo ob"edinenija "Vektor"**

(54) **METHOD FOR PREVENTION OF VIRAL DISEASES IN FISHES**

(57) Abstract:

FIELD: fish farming. SUBSTANCE: method involves treatment with some immunity-modulating agent by means of injections or exposure of fishes to a solution of such agent. The agent is interferon inducer based on double-spiral natural RNA. Injection doses may be 1-20 mg/kg of liveweight, and the solution for exposure is 0.5-

2 mg/l. The time of exposure is 30-60 min, with the use of the hyperosmotic filtration method with oxygen saturation of water as high as 80-100%. For hyperosmotic infiltration, fishes are preliminarily exposed to 5-6-% solution of sodium chloride. EFFECT: high method effectiveness; low cost; no environmental hazard. 2 cl, 3 tbl

RU 2 0 4 3 7 1 4 C 1

RU 2 0 4 3 7 1 4 C 1

Изобретение относится к области рыбоводства, а именно к способам борьбы с болезнями рыб.

Известен способ профилактики вирусных заболеваний лососевых рыб путем обработки их индуктором интерферона синтетического происхождения, являющимся двуспиральным полирибонуклеотидом (полиинозиновая-полицитидиловая кислота, поли И: поли Ц). Способ заключается в обработке рыбы препаратом путем инъекций в дозе 50 мг/кг массы тела или выдерживания рыбы в растворе препарата с концентрацией 400 мг/л в течение 3 ч. Для оценки защитного эффекта рыб заражали вирусом инфекционного некроза гемопозитической ткани (ИГН) или вирусом некроза эритроцитов рыб (НЭ). После инъекций препарата гибель рыб от ИГН снижалась на 30-45% а заболевания рыб от НЭ не отмечали ни после инъекций, ни после выдерживания рыб в растворе препарата, в то время, как заболеваемость в группе необработанных рыб составила 13%. Таким образом, известный способ обладает недостаточно высоким протективным действием, требует большого расхода дорогостоящего препарата и длительной экспозиции в нем рыбы, что делает его трудоемким и нерентабельным для применения в производственных условиях. Кроме того, испытанный препарат обладает высокой токсичностью для животных и не допущен органами ветеринарно-фармакологической службы для применения на практике.

Известный способ применялся только на лососевых рыбах массой от 1,3 до 15 г и не был испытан на других рыбах, что не позволяет рассматривать его в качестве универсального.

Задачей изобретения является создание высокоэффективного экологически чистого, недорогого, универсального и более технологичного метода профилактики вирусных заболеваний рыб.

Указанный результат достигается тем, что в способе профилактики вирусных заболеваний рыб, включающем обработку рыбы иммуномодулятором путем инъектирования или выдерживания в растворе препарата, согласно изобретению, в качестве иммуномодулятора используют индуктор интерферона на основе двуспиральной РНК природного происхождения, инъектирование рыб проводят в дозах 1-20 мг/кг массы тела, а выдерживание рыб осуществляют в растворе препарата с концентрацией 0,5-2 мг/л в течение 30-60 мин с использованием метода гиперосмотической инфильтрации при насыщении раствора кислородом до 80-100%. При этом гиперосмотическую инфильтрацию предпочтительно проводить предварительным выдерживанием рыб в течение 2 мин в 5-6% растворе хлористого натрия. Интенсификация рыбоводства сопряжена с появлением массы факторов (главным образом, антропогенной природы), оказывающих неблагоприятное, стрессовое воздействие на рыб, приводящее к развитию вторичных иммунодефицитов и снижению устойчивости к болезням. В этих условиях обработка иммуномодулятором рыб наиболее уязвимых групп в период максимального риска стимулирует общую резистентность организма, позволяя тем самым защитить рыбу от заболеваний. Использование в качестве иммуномодулятора индуктора интерферона дает возможность индуцировать у рыб выработку собственного, эндогенного, интерферона и отказаться от применения с этой целью экзогенного интерферона иной природы (человечьего, теплокровных и т.п.), защитное действие которого в организме гетерологичного хозяина (рыбы) будет явно незначительным. Интерферон известен как фактор неспецифической резистентности, обладающий широким спектром активности, которая проявляется как в стимуляции им различных звеньев иммунной системы, так и в действии его против патогенов разной природы. Предлагаемый в качестве иммуномодулятора индуктор интерферона является двуспиральной РНК, полученной из дрожжей. Использование указанного интерферонгена, в отличие от синтетических полирибонуклеотидов, позволяет исключить нежелательную нагрузку на окружающую среду, поскольку РНК природного происхождения легко утилизируется в организме.

Предлагаемый иммуномодулятор выгодно отличается от других известных средств борьбы с заболеваниями химиопрепаратов и вакцин. В отличие от первых, он не требует многократного длительного применения, а возбудители заболеваний не способны

вырабатывать устойчивость к нему. В противоположность вакцине, обеспечивающей защиту, как правило, от одного заболевания, иммуномодулятор способен защитить хозяина от целой группы разных заболеваний.

Препарат применяют для индивидуальной или групповой обработки рыбы.

- 5 Индивидуальная обработка целесообразна и экономически оправдана при работе с ограниченным количеством особей особоценных видов или пород рыб, а также рыб ремонтно-маточного стада. Она выполняется путем внутривентральной инъекции препарата, который обладает высоким защитным действием в диапазоне доз от 1 до 20 мг/кг массы тела. Дозы ниже 1 мг/кг дают менее выраженный защитный эффект,
- 10 использование высоких доз (более 20 мг/кг) экономически нецелесообразно. Рыбу младших возрастных групп обрабатывают групповым способом, применяя гиперосмотическую инфильтрацию препарата, использованную впервые для введения РНК. Используемые концентрации (5-6%) и экспозиция обработки в NaCl (1-2 мин) подобраны с таким расчетом, чтобы достичь максимально эффективного поглощения из воды задаваемого
- 15 препарата при обеспечении щадящего воздействия хлористого натрия на организм рыб. При концентрации хлористого натрия ниже 5% скорость проникновения препарата резко снижается, а концентрации выше 6% обладают сильным повреждающим действием на покровы рыб. Обработка в NaCl продолжительностью менее 1 мин не обеспечивает достаточного уровня абсорбции препарата из воды, а более 2 мин оказывает
- 20 неблагоприятное воздействие на физиологическое состояние рыб.

Содержание иммуномодулятора в воде в ходе групповой обработки рыб снижено до предельно низких величин (0,5-2 мг/л), чтобы сделать метод экономически оправданным. Концентрация препарата ниже 0,5 мг/л недостаточна для обеспечения защиты, а более 2 мг/л нецелесообразна, так как приводит к существенному удорожанию обработки.

- 25 Экспозиция в растворе препарата 30-60 мин обусловлена тем, что выдерживание менее 30 мин неэффективно, а более 60 мин избыточно.

Необходимость насыщения раствора препарата кислородом воздуха до 80-100% связана с тем, что обработка такого рода проводится путем помещения большого количества рыб в емкость ограниченного объема, что приводит к быстрому потреблению

30 растворенного в воде кислорода рыбами. Стресс, вызываемый дефицитом кислорода, приводит к существенному снижению эффективности поступления препарата из воды в ткани рыб.

- Пример 1. Профилактику весенней виремии рыб проводили на ограниченном количестве особей одной из селективируемых пород карпа путем индивидуальных
- 35 внутривентральных инъекций препарата двуспиральной дрожжевой РНК. 20 сеголеткам карпа средней массой 32,5 г внутривентрально (в/б) ввели препарат в дозе 10 мг/кг массы тела. Для этого ампулу препарата (8 мг) растворили в 12,3 мл среды Игла MEM и по 0,5 мл полученного раствора инъецировали рыбам. Контролем служили две группы по 20 рыб. Рыбам первой группы ввели по 0,5 мл среды Игла MEM, вторая группа оставалась
- 40 интактной. Рыбу каждой группы посадили в отдельный аквариум с проточной аэрируемой водой, температуру которой через сутки подняли с 8-10 до 13-15°C и поддерживали далее в этом диапазоне. Через двое суток после обработки всю рыбу заразили вирусом Rhabdovirus carpio возбудителем весенней виремии карпа путем в/б инъекции его в дозе
- 45 $10^{7,1}$ ТЦД₅₀/рыба. На протяжении всего опыта рыбу подкармливали комбикормом, наблюдение вели в течение 50 дней (до окончания эпизоотического процесса). Результаты представлены в табл. 1.

- Пример 2. Профилактику весенней виремии карпа проводили на годовиках карпа (средняя масса 47 г) путем внутривентрального инъецирования различных доз препарата двуспиральной дрожжевой РНК. Работу выполняли по схеме, аналогичной схеме опыта 1,
- 50 за исключением того, что контролем служила одна группа рыб, которым вводили среду Игла MEM, а заражение проводили вирусом в дозе 107,35 ТЦД₅₀/рыба. Результаты представлены в табл. 2.

Как свидетельствуют приведенные результаты, препарат обладал выраженным

защитным действием во всем диапазоне испытанных доз (1-20 мг/кг массы тела).

П р и м е р 3. Профилактику вирусной геморрагической септицемии (ВГС) у радужной форели проводили путем однократной обработки рыб препаратом двуспиральной дрожжевой РНК с использованием метода гиперосмотической инфльтрации. Для этого
5
приготовили 5,32%-ный раствор хлорида натрия и раствор препарата с концентрацией 2 мг/л. Для приготовления последнего препарат первоначально растворили в среде Игла МЕМ до концентрации 1 мг/мл и внесли полученный маточный раствор в воду в необходимом количестве. Работу выполняли на 4 группах рыб трехмесячного возраста по 40 экз. в каждой. Средняя масса рыб 590 мг. Рыб опытных групп 1 и 3 экспонировали в течение 2 мин в 0,5 л раствора хлорида натрия, а затем поместили на 30 мин в раствор
10
препарата при активной его аэрации. Рыбы групп 2 и 4 служили контролем и не подвергались обработке. После этого рыбу каждой группы посадили в отдельный аквариум с проточной аэрируемой водой. Через 3 сут рыбу всех групп заразили вирусом путем прекращения проточности на 1 ч и внесения в воду вируса-возбудителя ВГС в дозах
15
 10^4 (группы 1 и 2) и 10^5 ТЦД₅₀/мл (группы 3 и 4). После этого проточность возобновили. Наблюдение за рыбой вели на протяжении 40 дней (до завершения заболевания и гибели). Рыбу кормили форелевым комбикормом рецепта ЛС. Температура воды на протяжении всего времени находилась в пределах 9-11°C. Гибель рыб от ВГС составила: гр. 1 2,5% гр. 2 20% гр. 3 37,5% гр. 4 52,5%

П р и м е р 4. Профилактику ВГС осуществляли на пятимесячных мальках радужной форели средней массой 2,2 г по схеме, аналогичной схеме, приведенной в примере 3. Было использовано 2 группы рыб по 23 экз. в каждой. Одну (опытную) группу рыб обработали препаратом, вторая (контрольная) группа рыб была оставлена
20
необработанной. Спустя 3 сут рыбу заразили вирусом ВГС через воду в концентрации $10^{5,2}$ ТЦД₅₀/мл. Наблюдения вели в течение 51 дня. Гибель рыб от ВГС в опытной группе составила 34,8% в контрольной 50%

П р и м е р 5. 8-недельных мальков карпа средней массой 1 г обработали препаратом двуспиральной дрожжевой РНК с помощью метода гиперосмотической инфльтрации. Для этого предварительно приготовили два водных раствора. Раствор 1 5% раствор хлорида
30
натрия; раствор 2 раствор препарата с концентрацией 0,5 мг/л. Для приготовления последнего препарат первоначально растворили в среде Игла МЕМ до концентрации 1 мг/мл и внесли полученный маточный раствор в воде в необходимом количестве. 47 мальков карпа в сачке погрузили на 2 мин в 1,5 л раствора 1, а затем поместили в 1,5 л раствора 2. Обработку в этом растворе проводили в течение 1 ч при активной аэрации
35
воды (до 80-100% насыщения кислородом), после чего рыбу пересадили в аквариум с проточной аэрируемой водой. В аналогичный аквариум поместили контрольную группу из 45 рыб, не подвергавшихся никакой обработке. Через 2 сут заразили рыбу вирусом R. carpio, для чего ее выдерживали в течение 1 ч в воде, содержащей вирус в концентрации $10^{2,1}$ ТЦД₅₀/мл, и после этого возвращали в аквариумы.

В ходе обработки и на протяжении всего эксперимента температуру воды поддерживали в пределах 20-22°C. Рыбу подкармливали комбикормом. Наблюдение вели в течение 34 дней (до окончания эпизоотического процесса). Результаты опыта представлены в табл. 3.

П р и м е р 6. Годовиков карпа средней массой 40 г обработали препаратом двуспиральной дрожжевой РНК с помощью метода гиперосмотической инфльтрации. Для этого предварительно приготовили 6%-ный раствор хлорида натрия и раствор препарата с
45
концентрацией 2 мг/л. Растворы готовили аналогично тому, как это было сделано в примере 3. 30 годовиков карпа поместили на 1 мин в 3 л раствора хлорида натрия, а затем перенесли на 30 мин в 3 л раствора препарата при активной аэрации воды. Контрольную группу из 30 рыб после обработки хлоридом натрия поместили на 30 мин в
50
разбавленный растворитель (среду Игла МЕМ). После этого каждую группу рыб посадили в аквариум с проточной аэрируемой водой, температуру которой повысили в течение суток с 8 до 13-15°C и далее поддерживали в этих пределах. Через 2 сут рыбу обеих групп заразили R. carpio путем 6-часовой экспозиции в воде с концентрацией вируса

10^{6,5} ТЦД₅₀/мл, после чего ее возвратили назад в аквариумы. Наблюдение вели в течение 45 дней (до прекращения заболевания и гибели), подкармливая рыбу комбикормом. Гибель от заболевания в группе опытных рыб составила 6,7% против 33,3% в контроле.

5 Как видно из приведенных примеров, предлагаемый способ профилактики вирусных заболеваний рыб обеспечивает высокий уровень защиты рыб от заболеваний при незначительном расходе препарата и малом времени обработки, что делает его экономически оправданным и технологичным при использовании в производстве. Он экологически чист и применим для профилактики различных заболеваний разных видов рыб.

10

Формула изобретения

1. СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЫБ, включающий обработку рыбы иммуномодулятором путем инъектирования или выдерживания в растворе препарата, отличающийся тем, что в качестве последнего используют индуктор интерферона на основе двуспиральной РНК природного происхождения, инъектирование рыб проводят в дозах 1 20 мг/кг массы тела, а выдерживание осуществляют в растворе препарата с концентрацией 0,5 2 мг/л в течение 30 - 60 мин с использованием метода гиперсоматической инфльтрации при насыщении воды кислородом до 80 100%
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что гиперсоматическую инфльтрацию иммуномодулятора осуществляют предварительным выдерживанием рыб в течение 1 2 мин в 5 6-ном растворе хлористого натрия.

25

30

35

40

45

50

Таблица 1

Группа рыб	Заболеваемость, %	Выживаемость, %
Опыт	50	95
Контроль 1 (инъекция Игла МЕМ)	100	10
Контроль 2 (интактная рыба)	100	20

Таблица 2

Группа рыб	Опыт (инъекция препарата)			Контроль
	1 мг/кг	10 мг/кг	20 мг/кг	Игла МЕМ
Выживаемость, %	95	100	100	25

Таблица 3

Группа рыб	Среднее время выживания, сут	Выживаемость, %
Опыт	11,2	42,6
Контроль	8,4	6,7