

附件 1

水产养殖用抗菌药物药效试验技术指导原则

一、概述

水产养殖用抗菌药物药效试验用于评价抗菌药物防治水产动物目标适应证的效果和发现可能存在的不良反应,以确定药物的有效性和给药方案。

本指导原则适用于水产养殖用抗菌药物的药效试验(Ⅱ期临床试验),仅代表目前对水产养殖用抗菌药物药效试验研究的一般性认识,旨在为水产养殖用抗菌药物药效试验研究者和注册申请人制订、实施与监督药效临床试验等提供技术指导和参考。

二、试验设计原则

试验应遵循《兽药临床试验质量管理规范》(兽药 GCP)的规定。

试验设计应遵循“随机、对照、重复”的基本原则。随机,即按机遇原则进行分组、取样和试验;对照,进行试验研究必须设立对照组,通过对照来鉴别处理因素与非处理因素之间的差异,抵消或减少试验误差;重复,即实验要有足够的样本含量,有重复的例数和平行操作,且试验结果要有重现性。此外还应考虑均衡原则,均衡就是使对照组与试验组中的非处理因素尽量达到均衡一致,使

处理因素的试验效应能更真实地反映出来。

不同的抗菌药物作用机制不同,各有特点,本指导原则不可能涵盖水产养殖用抗菌药物药效试验研究的全部实际情况,开展药效试验研究时应结合受试药物的自身特点、受试动物及其感染疾病的种类,遵循“具体问题具体分析”的原则,根据实际情况确定药效试验的内容和顺序。

三、基本内容

(一) 环境条件

每个试验水体应能保持环境稳定,不受外界环境变化或污染的影响,且相对独立。试验水体必须能满足水产动物的生理要求,单位试验水体体积一般不小于 100L,放养密度应控制在不影响受试动物正常生理活动的范围。

试验用水的水质应符合 GB11607《渔业水质标准》要求,自来水应曝气 48h 以上,天然水应自然沉淀 24h 再过滤后使用。一般应在以下表格中规定的条件下进行试验,特殊情况下按自然发病水温进行试验。

水产动物		水温 (°C)	溶解氧 (mg/L)	pH	盐度 (‰)
淡水种类	温水性	18-28	≥5.0	6.5-8.0	≤5
	冷水性	10-18			
海水种类	温水性	20-30	≥4.0	7.5-8.5	15-35
	冷水性	10-18			

必要时可采取充气、换水、控温等措施以满足受试动物必要的

正常生长条件,试验期间应按要求定期测定并记录水温、pH、溶解氧或盐度(海水)等参数,试验用水的排放应符合兽药 GCP 相关要求。

(二)受试动物

根据试验的具体要求,合理选择相应种类的健康水产动物,受试动物来源于规范的水产养殖生产单位。试验前应在试验环境暂养 1~2 周。

试验用水产动物数量应满足统计学要求,一般规定每个试验组设 3 个平行,每个平行的试验动物最低数量:鱼类幼体 30 尾,成体 15 尾;虾、蟹、贝、参类幼体(变态后与成体相似的幼体)40 只,成体 20 只;龟、鳖、蛙类幼体(变态后与成体相似的幼体)20 只,成体 10 只。

(三)试验药物

1. 受试药物及来源。受试药物应与拟上市的制剂完全一致,有相应的产品质量标准。受试药物应采用一定规模生产的一个批次样品,产品处方、制备工艺、设备应与最终生产条件一致,并在 GMP 车间生产。

受试药物需有名称、生产厂家、生产批号、含量(或规格)、贮藏条件等信息,并具有农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。

2. 对照药物及来源。对照药物应当已在我国批准上市,与受

试药物作用相似、适应证相同的药物。对照药物由申报单位提供，并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。无符合要求的对照药物时，选择安慰剂作为对照药物。

(四) 疾病模型选择

采用的疾病模型包括人工感染和自然感染两种，可能的情况下，尽量采用人工感染。

1. 人工感染。感染用的菌种应为具有代表性的标准致病菌种或专业机构鉴定保藏的菌种。如果采用自然感染病例分离的菌株，应详细记录其来源，并应经专业科研或检测机构鉴定方可用于试验。攻毒前需测定其包括受试药物和对照药物（但不限于受试药物和对照药物）在内的最低抑菌浓度（MIC），必要时测定最低杀菌浓度（MBC）。感染前需进行预试验。感染途径可采用注射、浸浴和涂抹病原菌等感染方式。感染量以能使80%以上感染动物死亡或出现明显发病症状的剂量为最佳。试验菌株经培养后配制成一定浓度的菌液，按照预实验确定感染途径和感染量进行感染。

也可采用与自然感染水产动物同居进行感染，但应对所用的自然感染水产动物的致病菌进行分离鉴定，以便确诊病原。

人工感染的病例需通过发病过程和临床症状诊断，证明水产动物已感染接种致病菌并发病后才能作为试验病例。通过临床症状不能诊断的，可通过对致病菌的分离鉴定进一步确诊。

2. 自然感染。应制订自然感染病例入选条件。通过发病过

程、临床症状、病理剖检、致病菌的分离鉴定,或血清学诊断,确诊为试验所需致病菌感染的发病动物才能作为试验病例,各组试验病例的发病严重程度应基本一致。

(五) 试验分组

应采用随机分组原则,试验组数取决于抗菌药物的类型、疾病的特征以及有效剂量的筛选等因素,临床试验一般应满足如下要求:

1. 不感染不给药对照组;
2. 感染不给药对照组;
3. 对照药物组,应按照批准的给药方案给药;
4. 受试药物组,根据受试药物的药代动力学、体外抑菌试验以及剂量筛选的试验结果初步确定的给药剂量,至少设高、中、低三个剂量组,中剂量一般为拟推荐剂量。

如受试药物为复方制剂,应根据组方中各主要成分,分别增设单方药物的推荐剂量对照组。

(六) 给药方案

临床试验采用受试药物拟推荐的给药途径,注射给药应标明注射部位。若受试药物有多种给药途径,应该对每种给药途径分别进行试验。根据受试药物特性和药代动力学、体外抑菌试验结果制定合理的给药剂量、频次和疗程。

一般要求在感染后个别动物出现症状即开始给药;自然感染

病例在病因确诊后开始给药。

(七)观察时间

结合受试抗菌药物的药效学和药代动力学特性、受试水产动物、药效试验研究方案等确定观察时间点和观察时长。一般要求在停止给药后还应继续观察7天以上。

(八)观察指标

试验期间每天观察和记录各组受试水产动物的发病时间、发病数、死亡时间、死亡数或存活数、症状出现或消失数等,同时注意采食量和行为的观察。对于试验期间死亡动物须进行病理检查或病原菌分离,以确认受试动物是否因病原菌感染引起,如因其它原因死亡的,统计时应剔除。试验结束后,对存活动物进行病理检查。

四、效果评价

(一)评价指标

应根据详细的试验记录,计算各组受试动物发病率或死亡率、有效率和/或治愈率等。其计算公式如下:

发病率(%) = 发病动物数 / 受试动物数 × 100% ;

死亡率(%) = 死亡动物数 / 受试动物数 × 100% ;

有效率(%) = 症状好转动物数 / 发病动物数 × 100% ;

治愈率(%) = 症状消失动物数 / 发病动物数 × 100% 。

必要时,也可以配合采用其它指标进行评价。

(二) 效果评价

1. 试验的可靠性。在整个试验中,对照药物组必须有效,感染不给药对照组死亡率 $\geq 80\%$ 或发病率 $\geq 80\%$,不感染不给药对照组存活率 $\geq 90\%$,否则试验需重做。

2. 试验的有效性。以发病率或死亡率、有效率和/或治愈率进行判断,并将受试药物组间、受试药物组与对照组(包括不感染不给药对照组、对照药物组或感染不给药对照组)进行比较,对结果进行定性和定量的统计分析。常用的生物统计方法有t检验、x²检验、方差分析等,应根据实际情况进行选用。

3. 结论。根据临床症状、病理学变化观察和统计学分析结果,确定受试药物对本适应证的有效剂量及临床推荐剂量;并提出临床应用该药物的注意事项、不良反应等。

五、试验报告

为公正、科学地评价药物的临床疗效,试验报告应包括如下内容:

1. 试验目的;
2. 试验时间与地点;
3. 试验设计者、负责人、主要试验人员及联系方式;
4. 试验水质条件:如水温、溶解氧、pH、盐度等;
5. 受试药物需注明药物名称、生产厂家、生产批号、含量(或规格),对照药物还需注明用法用量;

6. 试验动物的品种、来源、体重或体长、年龄、健康状况及检疫情况等；
7. 试验分组、感染方案、给药方案等；
8. 试验观察现象与结果、数据处理与效果评价等；
9. 结论；
10. 参考文献；
11. 试验单位(加盖公章)；
12. 应归档保存原始资料,并注明保存地点、联系人及联系电话。

附件 2

水产养殖用抗菌药物田间药效试验技术指导原则

一、概述

水产养殖用抗菌药物田间药效试验用于进一步验证水产养殖用抗菌药物在实际生产条件下对靶动物目标适应证的有效性和安全性。

本指导原则适用于水产动物用抗菌药物的田间药效试验,仅代表目前对水产养殖用抗菌药物田间药效试验研究的一般性认识,旨在为水产养殖用抗菌药物田间药效试验研究者和注册申请人制订、实施与监督临床药效试验等提供技术指导和参考。

二、试验设计原则

试验应遵循《兽药临床试验质量管理规范》(兽药 GCP)的规定。

田间药效试验应在水产养殖用抗菌药物药效试验结果的基础上进行,参照水产养殖用抗菌药物药效试验的试验方案,并结合实际养殖条件、环境情况和病情等综合考虑。

三、基本内容

水产养殖用抗菌药物田间药效试验的建立主要包括试验池、

受试水产动物和数量的选择,试验药物的说明,给药方案以及观察指标的确定等。

(一) 试验养殖单元要求

田间试验须安排在历年发病地区,饲养规范,实验条件能得到有效控制的养殖场进行。试验养殖单元可为水产养殖生产上所用的池塘、网箱及工厂化养殖车间等设施,每个试验养殖单元应相对独立,并配备必要的养殖工具和设施。同一区域内试验池要求位置、面积、环境条件基本相似。养殖品种、放养密度、历史条件和病史基本一致。

试验期间应测定并记录试验池水的水温、溶解氧、pH 值、氨氮、亚硝酸盐和盐度(海水)等水质指标。

(二) 受试动物

1. 数量。选用自然感染的水产动物或人工控制感染的水产动物,每个养殖单元水产动物数应不少于 300 尾(只),珍稀水产动物视情况而定。

2. 品种。应与受试药物拟推荐应用范围相一致。不同靶动物品种和不同适应证应分别进行田间药效试验。应测定并记录放养动物的种类、规格、比例、数量等指标。

3. 抽检动物数。每个平行组分别在给药前和给药疗程结束后进行抽检(必要时,需在观察过程中抽检一次),随机抽取水产动物的最低检查数量应不低于 15 尾(只)。

(三) 试验药物

1. 受试药物及来源。受试药物应与拟上市的制剂完全一致，有相应的产品质量标准。受试药物应采用一定规模生产的一个批次样品，产品处方、制备工艺、设备应与最终生产条件一致，并在GMP车间生产。

受试药物需注明其名称、主要辅料、生产厂家、生产批号、含量（或规格）、保存条件，并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。

2. 对照药物及来源。对照药物应当已在我国批准上市，与受试药物靶动物以目为分类基础相似、作用相似、适应证相同。对照药物由申报单位提供，并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。无符合要求的对照药物时，选择安慰剂作为对照药物。

(四) 病例的确诊

选择的自然感染病例应通过发病过程、临床症状、病理剖检、致病菌的分离鉴定或者快速诊断来确诊，只有符合试验所需致病菌感染的发病动物才能作为试验病例，各组试验病例的发病严重程度应基本一致。每个单元确诊不少于5尾。

(五) 试验分组

田间药效的试验组数取决于抗菌药物的类型和疾病的特征，也可根据实验室药效试验的结果来确定。

试验分组应设对照药物组和受试药物组,条件允许的情况下,设置不给药对照组,受试药物组设2~3个平行。对于有推荐剂量范围的,至少设高、低二个剂量组。

(六) 给药方案

根据水产养殖用抗菌药物药效试验确定的用法和用量进行试验。试验期间不得使用其他药物。

(七) 观察时间

治疗试验在停止给药后继续观察不得少于7天。

(八) 观察指标

试验期间每天观察和记录各组受试水产动物的摄食量、活动状态、症状、死亡数和死亡时间等,并进行分析。同时观察和记录试验期间动物可能出现的不良反应。必要时,对受试动物进行病理检查和病原分离,以确认受试动物是否因目标病原菌感染发病,如因其它原因死亡的,统计时应剔除。

四、数据处理及效果评价

(一) 数据处理

应根据试验记录计算各组试验动物的死亡率或治愈率。其计算公式如下:

死亡率(%) = 死亡动物数 / 受试动物数 × 100% ;

治愈率(%) = (用药前抽检发病率 - 用药后抽检发病率) / 用药前抽检发病率 × 100% ;

(二) 效果评价

1. 试验的可靠性。在整个试验中,对照药物组必须有效,否则试验需重做。

2. 试验的有效性。试验以死亡率或治愈率进行判断,计算每个受试药物组每个平行的死亡率,并与对照药物组进行比较,对结果选择合适的生物统计分析方法进行分析,考察受试药物组与对照药物组的差异性。

3. 结论。根据摄食量、活动状态、症状和死亡率等,确认受试药物的推荐剂量;并提出或确认临床应用该药物的注意事项、不良反应等。

五、试验报告

为公正、科学地评价药物的临床疗效,试验报告应包括如下内容:

1. 试验目的;
2. 试验时间与地点,天气情况;
3. 试验设计者、负责人、主要试验人员及联系方式;
4. 试验池塘需注明换水率,水温、溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐氮、硬度、盐度、等水质条件;
5. 受试药物需注明药物名称、主要辅料、生产厂家、生产批号、含量(或规格),对照药物还需注明用法用量;
6. 试验动物的品种、来源、体重或体长、年龄、健康状况及检

疫情况等；

7. 试验分组、病例的确诊、给药方案等；

8. 试验观察现象与结果、数据处理与效果评价等；用药后水体其他生物的异常情况；

9. 结论；

10. 参考文献；

11. 试验单位(加盖公章)；

12. 应归档保存原始资料,并注明保存地点、联系人及联系电话。

水产养殖用驱(杀)虫药物药效试验技术指导原则

一、概述

水产养殖用驱(杀)虫药物的药效试验用于评价驱(杀)虫药物防治水产动物目标适应证的效果和发现可能存在的不良反应,以确定药物的有效性和给药方案。

本指导原则适用于水产养殖用驱(杀)虫药物的药效试验(Ⅱ期临床试验),仅代表目前对水产养殖用驱(杀)虫药物药效试验研究的一般性认识,旨在为水产养殖用驱(杀)虫药物药效试验研究者和注册申请人制订、实施与监督药效临床试验等提供技术指导。

二、试验设计原则

试验应遵循《兽药临床试验质量管理规范》(兽药 GCP)的规定。

试验设计应遵循“随机、对照、重复”的基本原则。随机,即按机遇原则进行分组、取样和试验;对照,进行试验研究必须设立对照组,通过对照来鉴别处理因素与非处理因素之间的差异,抵消或减少试验误差;重复,即试验结果要有重现性,要有重复例数和平行操作,且试验结果要有重现性。此外还应考虑均衡原则,均衡就是使对照组与试验组中的非处理因素尽量达到均衡一致,使处理

因素的试验效应能更真实地反映出来。

不同的驱(杀)虫药物作用机制不同,各有特点,本指导原则不可能涵盖水产动物用驱(杀)虫药物药效试验研究的全部实际情况,当进行药效试验研究时应结合该药物的自身特点、试验水产动物及其感染疾病的种类,遵循“具体问题具体分析”的原则,根据实际情况确定药效试验的内容和顺序。

三、基本内容

(一)环境条件

每个试验水体应能保持环境稳定、不受外界环境突然变化或污染影响,相对独立。试验水体必须能满足水产动物的生理要求,单位试验水体体积一般不小于 100L,放养密度应控制在不影响受试动物正常生理活动的范围。

试验用水的水质应符合 GB11607《渔业水质标准》要求,自来水应曝气 48h 以上,天然水应自然沉淀 24h 再过滤后使用。一般应在以下表格中规定的条件下进行试验,特殊情况下按自然发病水温进行试验。

水产动物		水温(°C)	溶解氧(mg/L)	pH	盐度(‰)
淡水种类	温水性	18-28	≥5.0	6.5-8.0	≤5
	冷水性	10-18			
海水种类	温水性	20-30	≥4.0	7.5-8.5	15-35
	冷水性	10-18			

必要时可采取充气、换水、控温等措施满足以上规定的试验条

件,试验期间应按要求定期测定并记录水温、pH、溶解氧或盐度(海水)等参数,试验用水的排放应符合兽药 GCP 相关要求。

(二)受试动物

根据试验的具体要求,合理选择相应种类的健康水产动物,受试动物来源于规范的水产养殖生产单位。试验前应在试验环境暂养 1~2 周。

试验用水产动物数量应满足统计学要求,一般规定每个试验组设 3 个平行,每个平行的试验动物最低数量:鱼类幼体(变态后与成体相似的幼体)30 尾,成体 15 尾;虾、蟹、贝类幼体(变态后与成体相似的幼体)40 只,成体 20 只;龟、鳖、蛙类幼体(变态后与成体相似的幼体)20 只,成体 10 只。

(三)试验药物

1. 受试药物及来源。受试药物应与拟上市的制剂完全一致,有相应的产品质量标准。受试药物应采用一定规模生产的一个批次样品,产品处方、制备工艺、设备应与最终生产条件一致,并在 GMP 车间生产。

受试药物需有名称、生产厂家、生产批号、含量(或规格)、贮藏条件等信息,并具有农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。

2. 对照药物及来源。对照药物应当已在我国批准上市,与受试药物作用相似、适应证相同的药物。对照药物由申报单位提供,

并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。无符合要求的对照药物时,选择安慰剂作为对照药物。

(四) 疾病模型选择

1. 人工感染。感染用的虫种可以为临床分离或采集的虫种,应详细记录其来源,且必须进行严格的病原鉴定。感染前需进行预试验。感染方法和途径可根据寄生虫体种类决定。感染量应根据预实验的结果,选择原则上能使90%以上动物感染的剂量,选取感染程度(症状表现、虫体密度等特征)基本一致的个体进行试验。以损伤或致死性的方式才能观察寄生虫感染情况的个体,感染率原则上应达到70%。

也可采用健康动物与自然感染个体进行同居感染,但应对所用的自然感染个体的致病虫体进行分离鉴定,以便确定病原种类。

2. 自然感染。采用自然感染的水产动物,应制订自然感染病例入选条件。通过临床症状、病理剖检、致病虫种的鉴定,确诊为试验所需致病虫体感染的发病动物才能作为试验病例,各组试验病例的发病严重程度应基本一致。

人工感染和自然感染病例的确诊。水产动物体表及鳃丝感染的虫体,试验前应随机抽取水产动物样品不少于10尾(只),轻轻刮取体表粘液或剪取小块鳃丝涂片镜检,感染率原则上应达到90%以上。水产动物体内感染的虫体,试验前应随机抽取水产动物样品不少于10尾(只),进行剖杀后检查组织或器官中虫体数,

感染率原则上应达到 70%。

3. 体外杀虫试验。特殊情况下,可进行离体(体外)杀虫试验。如中华蚤或多态锚头蚤,采集成虫若干,在适宜条件下孵化后,收集幼虫进行体外杀虫试验。

(五) 试验分组

试验组数取决于驱(杀)虫药物的类型、疾病的特征以及有效剂量的筛选等因素,试验应满足如下分组要求:

1. 不感染不给药对照组;
2. 感染不给药对照组;
3. 对照药物组,应按照批准的给药方案给药;
4. 受试药物组,根据受试药物剂量筛选的试验结果,确定给药剂量,至少设高、中、低三个剂量组,中剂量一般为拟推荐剂量。

如受试药物为复方制剂,药物对照组应根据组方中各主要成分,分别设单方药物的推荐剂量对照组。

(六) 给药方案

临床试验一般采用该药拟推荐的给药方案。受试药物若有多种给药方式,应该对每种给药方式分别进行试验。

(七) 观察时间

根据寄生虫的生活史,结合受试药物的药效学、受试动物、药效试验研究方案等确定观察时间点和观察时长。一般要求在停止给药后继续观察,口服驱虫药物时间不得少于 10 天,浸浴杀虫药

物时间不得少于7天。

(八)观察指标

给药前进行寄生虫学检查,按不同种类的寄生虫,分别检查受试动物的体表、鳃、血液、肠道等器官或组织,分类鉴定并计数。

给药后及时观察受试动物健康状况、行为特征和摄食情况,必要时进行生理生化指标检查。记录给药前后每天动物的死亡数。

驱杀体表寄生虫试验给药后,应定期随机抽样检查虫体存活情况,并分类鉴定计数,同时记录平均残存虫体数及残存虫体动物数。

驱杀体内寄生虫试验结束后,将全部试验水产动物剖杀,检查残存的虫体或虫卵,分类鉴定并计数,同时记录平均残存虫体数及残存虫体动物数。

四、数据处理与效果评价

(一)数据处理

应根据详细的试验记录,计算驱(杀)虫率、驱净率以及受试动物的日死亡率、总死亡率。公式如下:

驱(杀)虫率(%) = (感染不给药对照组平均残留存活虫体数 - 受试药物组平均残留存活虫体数) / 感染不给药对照组平均残留存活虫体数 × 100% ;

驱净率(%) = 驱净虫体的动物数 / 全部试验动物数 × 100% ;

日死亡率(%) = 每日死亡动物数 / 全部试验动物数 × 100% ;

总死亡率(%) = 试验期间死亡动物总数/全部试验动物数
×100%。

(二) 效果评价

1. 试验的可靠性。在整个试验中,对照药物组必须有效,感染不给药组感染率原则上应达到70%以上,不感染不给药组死亡率 $\leq 5\%$ 。

2. 试验的有效性。将受试药物组间、受试药物组与对照药物组进行比较,对驱(杀)虫率、驱净率、死亡率等数据进行统计分析。评价指标根据疾病发生的具体情况选择。常用的生物统计方法有t检验、 χ^2 检验和方差分析等,应根据实际情况进行选用。

3. 结论。确认受试药物对本适应证的治疗效果及其推荐剂量;并提出临床应用该药物的注意事项、不良反应以及药物的相互作用等。

五、试验报告

为公正、科学地评价药物的临床疗效,试验报告应包括如下内容:

1. 试验目的;
2. 试验时间与地点;
3. 试验设计者、负责人、主要试验人员及联系方式;
4. 试验条件:如水温、溶解氧、pH、盐度等;
5. 受试药物需注明药物名称、生产厂家、生产批号、含量(或

规格),对照药物还需注明用法用量;

6. 试验动物的品种、来源、体重或体长、年龄、健康状况及检疫情况等;

7. 试验分组、感染方案、给药方案等;

8. 试验观察现象与结果、数据处理与效果评价等;

9. 结论;

10. 参考文献;

11. 试验单位(加盖公章);

12. 应归档保存原始资料,并注明保存地点、联系人及联系电话。

水产养殖用驱(杀)虫药物田间药效试验 技术指导原则

一、概述

水产养殖用驱(杀)虫药物的田间药效试验用于进一步验证水产养殖用驱(杀)虫药物在实际生产条件下对靶动物目标适应证的有效性和安全性。

本指导原则适用于水产养殖用驱(杀)虫药物的田间药效试验,仅代表目前对水产养殖用驱(杀)虫药物田间药效试验研究的一般性认识,旨在为水产养殖用驱(杀)虫药物田间药效试验研究者和注册申请人制订、实施与监督药效临床试验等提供技术指导和参考。

二、试验设计原则

试验应遵循《兽药临床试验质量管理规范》(兽药 GCP)的规定。

田间药效试验应在水产养殖用驱(杀)虫药物药效试验结果的基础上进行,参照水产养殖用驱(杀)虫药物药效试验的试验方案,并结合实际养殖条件、环境情况和病情等综合考虑。

三、基本内容

(一) 试验养殖单元要求

田间试验须安排在历年发病地区,饲养规范,实验条件能得到有效控制的养殖场进行。试验养殖单元可为水产养殖生产上所用的池塘、网箱及工厂化养殖车间等设施,每个试验养殖单元应相对独立,并配备必要的养殖工具和设施。同一区域内试验池要求位置、面积、环境条件基本相似。养殖品种、放养密度、历史条件和病史基本一致。

试验期间应测定并记录试验池水的水温、溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐和盐度(海水)等水质指标。

(二) 受试动物

1. 受试动物要求。选用自然感染的水产动物或人工控制感染的水产动物,每个养殖单元水产动物数应不少于300尾(只),珍稀水产动物视情况而定。

2. 品种。应与受试药物拟推荐应用范围相一致。不同靶动物品种和不同适应证应分别进行田间药效试验。应测定并记录放养动物的种类、规格、比例、数量等指标。

3. 抽检动物数。每个平行组分别在给药前和给药疗程结束后进行抽检(必要时,需在观察过程中抽检一次),随机抽取水产动物的最低检查数量应不低于15尾(只)。

(三) 试验药物

1. 受试药物及来源。受试药物应与拟上市的制剂完全一致,有相应的产品质量标准。受试药物应采用一定规模生产的一个批次样品,产品处方、制备工艺、设备应与最终生产条件一致,并在GMP车间生产。

受试药物需注明其名称、生产厂家、生产批号、含量(或规格)、保存条件,并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。

2. 对照药物及来源。对照药物应当已在我国批准上市,与受试药物作用相似、适应证相同。对照药物由申报单位提供,并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。无符合要求的对照药物时,选择安慰剂作为对照药物。

(四) 病例的确诊

水产动物体表及鳃丝感染的虫体,轻轻刮取体表粘液或剪取小块鳃丝等病灶涂片镜检,确定给药前的感染率和感染强度。水产动物体内感染的虫体,进行剖杀后检查组织或器官中目标虫体数,确定给药前的感染率和感染强度。

(五) 试验分组

田间药效的试验组数取决于驱(杀)虫药物的类型和疾病的特征,也可根据实验室药效试验的结果来确定。

试验分组应设对照药物组和受试药物组,条件允许的情况下,

设置不给药对照组,受试药物组设 2~3 个平行。对于有推荐剂量范围的,至少设高、低二个剂量组。

(六) 给药方案

根据水产养殖用驱(杀)虫药物药效试验确定的用法和用量进行试验,受试药物若有多种给药方式,应该对每种给药方式分别进行试验。试验期间不得使用其他药物。

(七) 观察时间

根据寄生虫的生活史,结合受试药物的药效学、受试动物、药效试验研究方案等确定观察时间点和观察时长。一般要求在停止给药后继续观察,口服驱虫药物时间不得少于 10 天,浸浴杀虫药物时间不得少于 7 天。

(八) 观察指标

给药前进行寄生虫学检查,按不同种类的寄生虫,分别检查受试动物的体表、鳃、血液、肠道等器官或组织,分类鉴定并计数。

给药后及时观察受试动物健康状况、行为、摄食以及死亡情况,并对死亡病例进行剖检。必要时进行生理生化指标检查。

驱杀体表寄生虫试验给药后,应定期随机抽样检查虫体存活情况,并分类鉴定计数,同时记录平均残存虫体数及残存虫体动物数。

驱杀体内寄生虫试验结束后,将随机抽取一定数量的试验水产动物进行剖杀,检查残存的虫体或虫卵,鉴定并分类计数,同时

记录平均残存虫体数及残存虫体动物数。

四、数据处理与效果评价

(一) 数据处理

应根据详细的试验记录,计算驱(杀)虫率、驱净率以及受试动物的日死亡率。公式如下:

驱(杀)虫率(%) = (用药前平均残留存活虫体数 - 用药后平均残留存活虫体数) / 用药前平均残留存活虫体数 × 100% ;

驱净率(%) = (用药前抽检带虫率 - 用药后抽检带虫率) / 用药前抽检带虫率 × 100% ;

日死亡率(%) = 每日死亡动物数 / 全部试验动物数 × 100% ;

总死亡率(%) = 试验期间死亡动物总数 / 全部试验动物数 × 100% 。

(二) 效果评价

1. 试验的可靠性。在整个试验中,对照药物组必须有效,否则试验需重做。

2. 试验的有效性。将受试药物组间、受试药物组与对照药物组进行比较,对驱(杀)虫率、驱净率、死亡率等数据进行统计分析。常用的生物统计方法有 t 检验、 χ^2 检验和方差分析等,应根据实际情况进行选用。

3. 结论。确认受试药物对本适应证的治疗效果及其推荐剂量;并提出或确认临床应用该药物的注意事项、不良反应等。

五、试验报告

为公正、科学地评价药物的临床疗效,试验报告应包括如下内容:

1. 试验目的;
2. 试验时间与地点,天气情况;
3. 试验设计者、负责人、主要试验人员及联系方式;
4. 试验水质条件:如水温、溶解氧、pH、盐度等;
5. 受试药物需注明药物名称、主要辅料、生产厂家、生产批号、含量(或规格)、推荐使用的方法用量,对照药物还需注明用法用量;
6. 试验动物的品种、来源、体重或体长、年龄、健康状况及检疫情况等;
7. 试验分组、病例的确诊、给药方案等;
8. 试验观察现象与结果、数据处理与效果评价等;用药后水体其他生物的异常情况;
9. 结论;
10. 参考文献;
11. 试验单位(加盖公章);
12. 应归档保存原始资料,并注明保存地点、联系人及联系电话。

水产养殖用消毒剂药效试验技术指导原则

一、概述

水产养殖用消毒剂的药效试验用于评价水产养殖用消毒剂对水产动物机体外环境、工具及设施的消毒效果和(或)水产动物目标适应证的防治效果的相关试验,以确定消毒剂的有效性和合理使用方案,并发现可能存在的不良反应。

本指导原则适用于水产养殖用消毒剂的药效试验(包括消毒效果试验和目标适应证的防治效果试验),仅代表目前对水产养殖用消毒剂药效试验研究的一般性认识,旨在为水产养殖用消毒剂药效试验研究者和注册申请人制订、实施与监督药效临床试验等提供技术指导和参考。

新研制、仿制及其复合型水产养殖用消毒剂需根据本指导原则要求完成全部消毒试验项目;已批准在卫生或陆生动物上使用的消毒剂移植水产动物使用时,需完成实验室定性、定量消毒效果试验和现场消毒试验;国外注册水产养殖用消毒剂需复核定量及现场消毒试验;以泼洒或药浴方式用于养殖水体,并具有治疗水产动物疾病功效的消毒剂除完成相关要求的消毒效果试验外,还需

进行田间药效试验。

二、试验设计原则

试验应遵循《兽药临床试验质量管理规范》(兽药 GCP) 的规定。

试验设计应遵循“随机、对照、重复”的基本原则。随机,即按机遇原则进行分组、取样和试验;对照,进行试验研究必须设立对照组,通过对照来鉴别处理因素与非处理因素之间的差异,抵消或减少试验误差;重复,即试验要有足够的样本含量,有重复的例数和平行操作,且试验结果要有重现性。此外还应考虑均衡原则,均衡就是使对照组与试验组中的非处理因素尽量达到均衡一致,使处理因素的试验效应能更真实地反映出来。

三、基本内容

(一) 试验材料

1. 菌毒种。试验用菌(毒)种应为具有代表性的标准致病菌(毒)种或专业机构鉴定保藏的菌(毒)种。如果采用自然感染病例分离的菌株,应详细记录其来源,并应经专业科研或检测机构鉴定方可用于试验。在选择消毒试验用的致病病毒株时,注意所用病毒株应代表一个很明确的病毒组,抵抗力强,容易管理并可高滴度生长,且易于纯化。

水产动物临床常见的、有代表性的菌(毒)种如下所示,根据消毒剂特定用途或试验特殊需要,可增选其它菌(毒)株。

(1) 细菌繁殖体。气单胞菌 (*Aeromonas*) ; 爱德华氏菌 (*Edwardsiella*) ; 弧菌 (*Vibrio*) ; 链球菌 (*Streptococcus*) ; 黄杆菌 (*Flavobacterium*) 。

(2) 细菌芽孢。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 。

(3) 真菌 (根据用途选做)。水霉 (*Saprolegnia*) 。

(4) 病毒 (根据用途选取合适的病毒) 。

2. 培养基。普通肉汤培养基、营养琼脂培养基、马丁肉汤培养基、马丁琼脂培养基、沙堡液体培养基、沙堡琼脂培养基及其与试验菌种相对应有特别要求的培养基。培养基的选用和配制方法见兽药典。

3. 试验消毒剂

(1) 受试消毒剂及来源。

受试消毒剂应与拟上市的制剂完全一致,有相应的产品质量标准。受试药物应采用一定规模生产的一个批次样品,产品处方、制备工艺、设备应与最终生产条件一致,并在 GMP 车间生产。

受试消毒剂需注明其名称、生产厂家、生产批号、含量(或规格)、保存条件,并提供农业农村部认定的检验机构出具的产品检验合格报告。

(2) 对照消毒剂及来源。

对照消毒剂应当已在我国批准上市,与受试消毒剂作用相似、适应证或用途相同。由申报单位提供,并提供农业农村部认定的

检验机构出具的产品检验合格报告。

4. 中和剂。选择的中和剂应对试验菌种无抑制作用,在最大试验浓度的消毒剂中加入中和剂后对试验菌种的抑制作用应完全消除,此时中和剂的浓度可以作为本试验添加浓度。常用消毒剂的中和剂参见下表。

表: 常用消毒剂的中和剂

消毒剂(浓度)	中和剂(浓度)
含氯(溴、碘)消毒剂(有效氯、溴或碘 0.1~0.5%)	硫代硫酸钠(0.1%~1.0%)
过氧乙酸(0.1~0.5%)	硫代硫酸钠(0.1%~0.5%)
过氧化氢(1.0~3.0%)	硫代硫酸钠(0.5%~1.0%)
戊二醛(2%)	甘氨酸(1%)
季铵盐类消毒剂(0.1~0.5%)	吐温 80(0.5~3.0%)
洗必泰(0.1~0.5%)	卵磷脂(1.0~2.0%)
含表面活性剂的各种复方消毒剂	吐温 80(3.0%)
酚类消毒剂(3.0~5.0%)	吐温 80(3.0~5.0%)
碱类消毒剂	等当量酸
酸类消毒剂	等当量碱

(二) 试验方法

试验菌(毒)种选用水产动物临床常见的、有代表性的菌(毒)种或目的(目标)菌(毒)种。

1. 实验室消毒能力测定

试验一般分四组,即受试消毒剂组、对照消毒剂组、空白对照(不感染不处理)组和阴性对照(感染不处理)组。每组试验应做 3 个平行。

(1) 定性测定。细菌、真菌孢子测定方法:先将制备好的菌液

采用比浊法进行活菌计数,然后用 0.03M 的 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液稀释成含菌 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU/ml 的试验菌液,取 9 支试管,每管加无菌蒸馏水 2.5ml,于第 1 管加一定浓度的受试消毒剂溶液 2.5ml,混匀后,由第 1 管取 2.5ml 至第 2 管,按二倍稀释法依此类推,直至第 9 管,混合后取出 2.5ml 弃去,向每管加 2.5ml 试验菌液后置 20℃ 水浴中 5、10、30、60min 或其它特定的作用时间。以对照消毒剂溶液代替受试消毒剂溶液,同时进行上述各步骤,作为对照消毒剂组;另取 2 支试管,进行平行试验,其中一管只加菌液不加消毒剂的作为阴性对照,另一管不做任何处理的作为空白对照。每管各取 0.5ml 加入含足量中和剂的 4.5ml 液体培养基中,混匀,中和 10min,再取出 0.5ml 加入 4.5ml 液体培养基内。将接种菌株的培养基管置适宜温度下培养,若发生混浊即表示有细菌生长。若肉汤不变混浊,应继续培养至第 7d,若仍不混浊方可判为无菌生长。

结果判定:以无菌生长管消毒液的最低浓度为最低杀菌有效浓度,以无菌生长管的最短消毒时间为该浓度杀菌最快有效时间。

真菌菌丝测定方法在试验菌块制备、接种、中和剂添加体积和结果观测等方面应根据实际情况进行调整。

(2) 定量测定。细菌、真菌孢子测定方法:先将制备好的菌液采用比浊法进行活菌计数,然后用 0.03M 的磷酸盐缓冲液稀释成含菌 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 的试验菌液;吸取 0.5ml 试验菌液分别于测

试浓度的受试消毒剂 and 对照消毒剂溶液 4.5ml 内,置 20℃ 水浴 5min 或其它特定的作用时间,立即分别吸取上述菌药混合液 1.0ml,加入 9.0ml 与受试消毒剂 and 对照消毒剂相对应的中和液中混匀。以 0.03M 的磷酸盐缓冲液代替消毒剂溶液,同时进行上述各步骤,作为阴性对照组;以不做任何处理的作为空白对照。中和 10min 后采用平板菌落计数法进行活菌计数,计算杀菌率及杀灭指数。

活菌培养计数时,细菌繁殖体在适宜的温度下培养 18 ~ 24h,观察最终结果;细菌芽孢培养温度为 37℃,培养时间一般为 72h 后观察最终结果;真菌孢子在适宜的温度下培养 24h ~ 72h 后观察最终结果。

结果判断:

$$\text{消毒 } t \text{ 时的杀菌率 (Pt)} = ((n_0 - n_t) / n_0) \times 100\%$$

$$\text{杀灭指数 (KI)} = n_0 / n_t$$

以上两式中: n_0 为对照组活菌数, n_t 为实验组活菌数。

病毒测定方法:分别取不同浓度的消毒剂 4.5ml 与适当浓度的特定病毒溶液 0.5ml 混合,置 20℃ 水浴 5min 或其它特定的作用时间,同时设生理盐水或培养基为对照组。分别取上述各组溶液各 1ml,加入中和剂 9ml,混匀,作用 10min,倍比稀释,每个稀释度接种到敏感细胞上,测定其病毒滴度。

结果判断:

病毒灭活率% = (消毒前病毒滴度 - 消毒后病毒滴度) / 消毒前病毒滴度 × 100%

2. 养殖水体现场消毒试验。在完成实验室定性、定量消毒能力测定的基础上,进行特定病原菌和自然菌养殖水体现场消毒试验。根据消毒剂的杀菌性能及对水体理化指标、靶动物的影响程度,通过本试验确定实际使用方法、浓度及作用时间等。

(1) 目标病原菌养殖水体现场消毒试验。

试验用水:应符合 GB11607《渔业水质标准》要求,在 15d 以内未使用过任何消毒剂的池塘中取 200L 养殖水,分别装入 6 个水簇箱中,每箱 20L,试验前后测定并记录水体的 pH、溶解氧、水温、氨氮、亚硝酸盐和盐度(海水)等指标。将特定病原菌制成菌液加入养殖水体中,使水体中菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL。

试验分组:受试消毒剂组 一般设高、中(推荐使用浓度)、低三个浓度受试消毒剂试验组。

对照消毒剂组 按推荐使用浓度消毒。

阴性对照组 染菌不施消毒剂组。

空白对照组 不染菌不施消毒剂组。

测定方法:消毒前和消毒后 10、30、60min 或其它特定的作用时间采混匀后的各组水样 1ml,迅速加入 9ml 中和液中混匀,采用平板菌落计数法分别进行活菌计数,计算杀菌率。

结果判断:杀菌率 = (消毒前活菌数 - 消毒后活菌数) / 消毒前

活菌数 $\times 100\%$

(2) 养殖水体现场消毒试验。试验宜安排在历年发病地区, 饲养规范, 实验条件能得到有效控制的养殖场的三口池塘中进行。每个试验池应相对独立, 位置、水深、面积、环境条件基本相似。试验水体应符合 GB11607《渔业水质标准》要求, 在 15d 以内未使用过任何消毒剂的养殖池塘水。试验期间应测定并记录试验水体的水温、pH、溶解氧、透明度、氨氮、亚硝酸盐和盐度(海水)等水质指标, 同时观察试验池中鱼的摄食量、活动状态等。

该试验只设受试消毒剂组, 不设空白对照组和对照消毒剂组(由于每口池塘中的微生物种群、数量以及水体理化指标有差异), 根据受试消毒剂拟推荐的用法和用量进行试验, 试验应做 3 个平行。

消毒前和消毒后 30、60、120min 或其它特定的作用时间, 沿试验池塘对角线选取 3 个点(对角线两端离池塘边角 3m 各 1 个点, 正中心 1 个点), 用规格 1L 采水器分别于 3 个点的水面下 10 ~ 15cm 处(或其它特定要求的取样点)取水样, 然后混合, 吸取混匀后的水样 1ml 迅速加入 9ml 中和液中混匀, 置 4℃ 处冷藏保存不得超过 6 小时。采用平板菌落计数法分别进行活菌计数, 计算杀菌率。

3. 影响消毒剂消毒效果因素试验。用于养殖水体的消毒剂, 其药效往往受目标菌的种类、消毒剂浓度、消毒作用时间、消毒时

的水温、pH 值及有机物浓度等因素的影响。应采用单因素试验法（即除被试因素外，其他有关因素都固定在常用水平上）进行定量消毒试验，测定不同影响因素、不同水平上的杀菌率，并互相比较。

4. 田间药效试验。水产养殖用消毒剂以泼洒或药浴方式用于养殖水体后，可通过体表和鳃等组织器官进入水产动物体内，对体内病原菌起到抗菌作用，具有治疗水产动物疾病的功效，其药效试验设计方案参见《水产养殖用抗菌药物田间药效试验技术指导原则》。

（三）效果评价

1. 试验的可靠性。在整个试验中，对照消毒剂组必须有效；在实验室消毒能力测定试验中，阴性对照组必须有菌生长，空白对照不能有菌生长，否则试验需重做。

2. 测试消毒效能，其杀菌率或病毒灭活率应达 99.9% 以上。测试杀菌（灭毒）效能，其杀菌率或病毒灭活率须达 100%。当低于此指标时，则应提高消毒剂的浓度或延长作用时间，重新试验。

3. 消毒效果。以杀菌率或病毒灭活率进行判断，并将受试消毒剂组间、受试消毒剂组与对照组（包括对照消毒剂组或感染不施消毒剂组）进行比较，对结果进行定性和定量的统计分析。常用的生物统计方法有 t 检验、 χ^2 检验、方差分析等，应根据实际情况进行选用。

4. 结论。根据消毒效果统计结果，同时结合消毒剂对水体理

化因子、靶动物的影响情况以及影响消毒剂消毒效果因素试验结果,确认受试消毒剂的推荐剂量;并提出或确认临床应用该消毒剂的注意事项、不良反应等。

四、试验报告

为公正、科学地评价消毒剂的临床疗效,试验报告应包括如下内容:

1. 试验目的;
2. 试验时间与地点;
3. 试验设计者、负责人、主要试验人员及联系方式;
4. 试验水质条件:如水温、溶解氧、pH、盐度等;
5. 受试消毒剂需注明消毒剂名称、生产厂家、生产批号、含量(或规格),对照消毒剂还需注明用法用量;
6. 消毒能力定性与定量测定方法、养殖水体目标菌与自然菌的消毒试验方法;
7. 影响消毒剂药效因素试验方案(必要时);
8. 消毒剂田间药效试验方案(必要时);
9. 试验观察现象与结果、数据处理与效果评价等;
10. 结论;
11. 参考文献;
12. 试验单位(加盖公章);
13. 应归档保存原始资料,并注明保存地点、联系人及联系

电话。

五、名词解释

1. 消毒,是指用物理的、化学的或生物学的方法杀灭或清除外环境中的各种病原微生物,使之达到不至于引起疾病的数量。所谓“外环境”除包括无生命的固体物表面、液体和气体外,也包括有生命的动物机体的体表和浅表体腔。

2. 消毒剂,是主要用于杀灭外环境中病原微生物的化学药物。

3. 抗菌,是指抑制动物体内微生物的生长繁殖,或将其杀灭。主要指动物全身用药。

水生动物疫苗实验室安全试验 技术指导原则

一、目的

为水生动物疫苗实验室安全试验研究提供原则性指导。

二、背景

水生动物疫苗的安全性是考察其质量的最重要指标之一。农业部公告第 442 号对兽用疫苗制品的实验室安全试验项目进行了详细规定。

三、基本要求

(一) 生物安全要求

实验室及动物实验室的生物安全条件应符合国家有关实验室生物安全标准。

(二) 试验用动物的要求

1. 实验室安全试验应使用靶动物进行。有充分资料证明与靶动物安全试验结果有相关性时,可使用其他敏感的水生动物作为模式动物。

2. 实验室安全试验中所用实验动物应健康易感,不携带影响

试验结果判定的特定病原或特定抗体。必要时应使用普通级或SPF级易感实验动物。

3. 试验用动物的种类、年龄、个体大小、体重和生理状态(如性成熟)应与疫苗说明书中拟规定的靶动物相一致。试验用动物的来源/遗传背景应尽量避免存在差异性。

4. 试验中应使用敏感性高的品系。

5. 每批疫苗制品的实验室安全试验中所用水生动物应不少于30尾,来源困难或经济价值高的动物应不少于5尾。

(三) 养殖水质的要求

在疫苗接种期间,实验养殖用水的水质参数,如温度和盐度(如淡水与海水)应与疫苗应用的实际养殖环境相似。必要时应设置合理的温度梯度。

(四) 疫苗制品的要求

实验室安全试验中所用实验室制品的生产用菌(毒、虫)种、制品组成和配方等,应与规模化生产的产品相同。实验室制品应经过必要的性状、含量、纯粹/纯净性等初步检验,且结果须在预期的可接受范围内。实验室制品中主要成分的含量应不低于规模化生产时的出厂标准。

(五) 试验设计

1. 在试验开始前,应制定详细的实验室安全试验方案,其内容应包括受试疫苗的种类,试验开始和结束的日期,实验动物的年

龄、种类等特征,疫苗配方,对照组的设置,每组动物的来源和数量、饲养条件、试验管理和观察方式,结果的判定方法及标准等。

2. 试验时应设置空白对照组。如有对照疫苗,还可设对照疫苗组。

四、实验室安全试验的内容和方法

可采用肉眼观察和/或显微镜观察方法,至少观察 14 日。每日监测试验用动物的死亡、发病、全身和/或局部反应情况。应监测和记录所有不良反应的性质和频率。

(一)一次单剂量接种的安全试验

按照推荐的接种途径,用适宜规格(日龄、体重或体长)的靶动物,接种 1 个剂量,至少观察 2 周。评估指标应包括临床症状、局部炎症、组织病变等。对于可用于多种动物的疫苗制品,应用各种靶动物进行安全试验。

(二)多次接种的疫苗制品应进行单剂量重复接种安全试验

有关要求同一次单剂量接种的安全试验。

(三)一次超剂量接种的安全试验

按照一次单剂量接种的安全试验进行,但接种剂量为推荐免疫剂量的数倍至一百倍不等。通常情况下,灭活疫苗的安全试验剂量为推荐免疫剂量的 2 倍,活疫苗的安全试验剂量为推荐免疫剂量的 10~100 倍。根据不同使用途径选择合适的剂量。

(四)对共患病原微生物或已有文献报道有共感染的非靶动

物、非使用日龄靶动物的安全试验(活疫苗可能适用)

有些病原可感染多种动物或多个日龄段的动物,这类制品的安全试验中,除应考察疫苗制品对靶动物和使用日龄靶动物动物的安全性外,还应对非使用对象动物和非使用日龄动物进行实验室安全试验,以考察对靶动物群使用该疫苗制品后对非靶动物群可能引起的安全风险。

(五)疫苗水平传播试验(活疫苗可能适用)

评估使用该类疫苗免疫后,对周围饲养的同品种易感动物的潜在危害性及其对环境的污染,为正确使用疫苗提供科学依据。

(六)对靶动物生产性能的影响试验

对食用水生动物的疫苗制品应进行本项试验。使用这类疫苗制品后,观察记录一定周期内靶动物的生长情况,如体重变化、饲料系数等,评估疫苗制品对动物生产性能的影响。如果在一定试验周期内无法评价对生产性能的影响,可用临床试验数据代替。

(七)其他安全试验

用于制备水生动物疫苗的一些非生物源性物质,如矿物油佐剂、铝胶佐剂等,用于食品动物后,可能对人类的生命健康造成危害,这类制品的安全试验中应包括有关化学物质在靶动物体内的残留试验,为制定该制品的休药期提供必要的支持性数据。

(八)相关说明

上述实验室安全试验项目中,第(一)和(三)项试验通常是必

不可少的,第(二)、(四)、(五)、(六)、(七)项试验有时不是必须的,应根据疫苗制品的种类、性质、靶动物等具体情况选择进行。第(三)项内容通常是制定成品安全检验标准的最直接依据,应有连续3批实验室疫苗制品的试验数据。

水生动物疫苗实验室效力试验 技术指导原则

一、目的

为水生动物疫苗实验室效力试验研究提供原则性指导。

二、背景

水生动物疫苗的免疫效力是考察其质量的最重要指标之一。农业部公告第 442 号对兽用疫苗的实验室效力试验项目进行了详细规定。

三、基本要求

(一) 生物安全要求

实验室及动物实验室的生物安全条件应符合国家有关实验室生物安全标准。

(二) 实验用动物的要求

1. 实验室效力试验应使用靶动物进行。有充分资料证明与靶动物效力试验结果有平行关系的,可使用其他动物作为替代动物。

2. 实验室效力试验中所用试验用动物应健康易感,不携带影

响试验结果判定的特定病原或特定抗体。必要时应使用普通级或SPF级易感实验动物。

3. 试验用动物的种类、年龄、个体大小、体重和生理状态(如性成熟)应与疫苗说明书中拟规定的靶动物相一致。试验用动物的来源/遗传背景应尽量避免存在差异性。

4. 每批疫苗制品的实验室效力试验中所用水生动物应不少于30尾,来源困难或经济价值高的动物应不少于5尾。

(三) 养殖水质的要求

在疫苗接种期间,实验养殖用水的水质参数,如温度和盐度(如淡水与海水)应与疫苗应用的实际养殖环境相似。必要时应设置合理的温度梯度。

(四) 对制品的要求

实验室效力试验中所用实验室疫苗制品的生产用菌(毒、虫)种、制品组成和配方等,应与规模化生产的产品相同。实验室疫苗制品应经过必要的性状、含量、纯粹/纯净性等初步检验,且结果须在预期的可接受范围内。

为了同时证明产品“规程”中所规定的基础种子使用代次范围的合理性,通常用处于最高代次水平的病毒(或细菌)抗原制备疫苗后,进行效力试验。一旦试验结果证明最高代次水平的疫苗具有令人满意的免疫效果,则可认为规定范围内的基础种子均具有令人满意的免疫原性。

如果每批规模化生产的产品出厂时的“效力检验”采取与参考疫苗对比的方法,则在实验室效力试验中,除应使用实验室制品进行效力试验外,还应用参考疫苗进行系统的效力试验。

(五)对攻击用强毒的要求

1. 在多数实验室效力试验中可能会使用攻毒用强毒。对已经有国家标准强毒株的,应使用标准强毒株,必要时增加使用当时的流行株。对没有国家标准强毒株的,可使用自行分离的强毒株,但需报告其来源、历史和有关鉴定结果。

2. 使用高致病性病原微生物的,应按有关规定事先获得有关部门批准。

(六)试验设计

1. 在试验开始前,应制定详细的实验室效力试验方案,其内容应包括受试疫苗的种类,试验开始和结束的日期,试验用动物的年龄、种类等特征,疫苗配方,对照组的设置,每组动物的来源和数量、饲养条件、试验管理和观察方式,结果的判定方法及标准等。

2. 试验时应设置空白对照组。如有对照疫苗,还可设对照疫苗组。

四、实验室效力试验的内容及方法

(一)靶动物免疫攻毒试验

该方法是考察水生动物疫苗免疫效力的常规方法。其基本方法是:用实验室疫苗制品接种一定数量的动物,经一定时间后,采

用攻毒用强毒株同时对上述免疫动物和对照动物进行攻毒,在攻毒后一定时间内,观察动物的发病或死亡情况,统计免疫及对照动物发病率或死亡率,或计算相对保护率,评估制品的效力;必要时,在观察期结束时,将所有动物扑杀,进行病理组织学检查,有时还应进行病原分离,根据免疫动物和对照动物的眼观病理学变化、组织病理学变化或病原分离情况评估制品的免疫效力。靶动物免疫攻毒试验的具体方法可分为定量免疫定量强毒攻击法、变量免疫定量强毒攻击法、定量免疫变量强毒攻击法等,具体试验中可根据疫苗制品和疾病的具体情况选择一种或数种适宜方法。

1. 定量免疫定量强毒攻击法。该方法中以定量的受试疫苗接种适宜动物,经一定时间后,用定量的强毒进行攻击,观察动物接种后所建立的免疫力。

2. 定量免疫变量强毒攻击法。该方法中将动物分为两大组,一为免疫组,一为对照组,两大组又各分为相等的若干小组,每小组的动物数相等。免疫组各小组动物均用同一剂量的受试疫苗进行免疫接种,经一定时间后,与对照组一起,同时用不同稀释度强毒进行攻击,观察、统计免疫组与对照组各小组的发病率、死亡率、病变率或感染率,分别计算免疫组与对照组的 LD₅₀(或 ID₅₀),比较免疫组与对照组动物对不同剂量强毒攻击的耐受力。

3. 变量免疫定量强毒攻击法(PD₅₀ 试验)。该方法中疫苗稀释为不同的免疫剂量,并分别接种动物,间隔一定时间待动物的免

疫力建立以后,各免疫组均用同一剂量的强毒攻击,观察一定时间,用统计学方法计算能使 50% 的动物得到保护的免疫剂量 (PD50)。

4. 有关说明。如因动物来源困难等导致无法用靶动物建立适宜的攻毒模型,并有充分的科学依据证明采用替代动物抗体测定法、替代动物免疫攻毒法等其他方法与靶动物免疫攻毒效力之间有一定相关性时,可采用替代方法取代靶动物免疫攻毒试验。

(二)疫苗抗原(细菌或病毒)含量与靶动物免疫攻毒保护力相关性的研究(最小免疫剂量试验)

疫苗内抗原(细菌或病毒)含量与免疫攻毒保护率之间,在一定范围内通常存在明显平行关系,可根据最小免疫剂量试验结果建立疫苗成品的抗原(细菌或病毒)含量标准,对符合抗原(细菌或病毒)含量标准的疫苗,就无需对每批疫苗进行免疫攻毒效力检验。最小免疫剂量的试验方法如下:用不同剂量的疫苗分别接种动物,经一定时间后进行攻毒或采用已经证明与免疫攻毒方法具有平行关系的替代方法进行免疫效力试验,统计出使动物获得较好保护力(通常应达到 80% ~ 100%)的最低的疫苗接种量,就是最小免疫剂量。如果疫苗使用对象包括多种动物或多种日龄动物,则应针对各种或各日龄段靶动物测定最小免疫剂量。

(三)免疫产生期及免疫持续期试验

1. 用实验室疫苗制品接种一定数量的动物。接种后,每隔一

定时间,用攻毒用强毒对一定数量的免疫动物和未接种的对照动物同时进行攻毒或采用已经确认与攻毒保护率具有平行关系的血清学方法测定抗体水平,观察其产生免疫力的时间、免疫力达到高峰期的时间及高峰期持续时间。以接种后最早出现良好免疫力的时间为该疫苗制品的免疫产生期,以接种后保持良好免疫力的最长时间为免疫持续期。

2. 如果是季节性疾病,只要能够证明疫苗的免疫力能持续到接种后的一年中疾病的自然发生期末。不论是否进行加强免疫接种,均应提出在此后一年(或几年)的发病季节中的免疫力情况。

3. 免疫期试验应在严格控制的实验室条件下进行。若因免疫期过长、人工饲养对实验用动物影响过大等原因导致已有实验室条件不足以满足整个免疫期内的试验,则可在临床试验中进行免疫期验证。在进行临床免疫期试验的过程中,应确保疫苗接种的靶动物不发生并发性感染,有必要设同池未接种的靶动物作对照(哨兵动物),以监视动物是否受到田间感染。

4. 主动免疫的免疫期通常是指用受试疫苗进行一次接种后提供的保护作用的持续期。通常应在所推荐的加强接种开始的时间之前,对接种过的动物进行攻毒来确定。

5. 如有充分的试验依据证明适当指标(如抗体水平)与靶动物免疫攻毒保护率间存在良好的定性或定量关系,则可用替代指标来衡量疫苗接种后的免疫力。

6. 通常情况下,不接受用非靶动物试验获得的免疫期试验数据。

(四)血清学效力检验与靶动物免疫攻毒保护相关性的研究

当成品的效力检验中采用血清学方法测定免疫动物抗体反应,而不采用免疫攻毒试验时,应事先进行平行关系验证试验,以证明选用该血清学方法的科学性。具体试验方法是:用不同剂量的受试疫苗免疫接种动物,以便获得具有不同抗体水平的动物,根据抗体水平的高低,将动物分为若干组,用已经选定的强毒株按照预定剂量进行攻毒。对抗体水平与攻毒保护率之间的关系进行分析。

(五)不同血清型或亚型间的交叉保护力试验

有些传染病病原存在多个血清型或血清亚型,应进行交叉保护力试验。其方法为:用推荐使用剂量疫苗接种一定数量的动物,在产生免疫力后,分别用不同血清型或血清亚型的强毒株进行攻毒,观察其交叉保护力。通过本试验筛选疫苗菌(毒、虫)株,并为合理使用疫苗提供依据。

(六)替代动物的效力检验与靶动物效力检验结果相关性的研究

一些制品的效力检验用靶动物来源困难、费用高,可使用替代动物,但应进行靶动物与替代动物免疫攻毒保护力平行关系的试验研究,证明具有平行关系者,方可用替代动物代替靶动物。

(七)不同接种途径对靶动物的效力试验

水生动物疫苗的接种途径主要包括注射、口服和浸泡等。根据制品的种类、特点,以及相关试验数据,选用合适的接种途径作为推荐接种途径。

(八)接种后动物体内抗体消长规律的研究

免疫动物后,定期采血测定免疫动物产生抗体的最早时间、抗体高峰期、抗体持续期,为制定免疫程序提供依据。

(九)相关说明

上述实验室效力试验项目中,第(一)、(二)、(三)通常是必不可少的,第(四)、(五)、(六)、(七)、(八)项有时不是必须的,应根据制品的种类、性质、靶动物、质量标准等具体情况选择进行。第(一)项通常是成品效力检验标准的最直接依据,应有连续3批实验室制品的试验数据。