防治奶牛乳腺炎的抗微生物药
靶动物安全性和有效性试验指导原则

一、概述

**（一）目的**

为指导申报单位开展抗微生物药物防治奶牛乳腺炎的安全性和有效性研究，特制定本指导原则。

**（二）适用范围**

适用于通过乳房灌注给药防治奶牛乳腺炎的制剂。

**（三）术语**

乳腺炎（Mastitis）：通常是由一种或多种病原微生物引起的乳腺炎症，以乳腺上皮细胞发生病理学改变为特征，继而出现炎症反应和分泌变化，受感染乳区白细胞增多。

临床型乳腺炎（Clinical infectious mastitis）：1个或多个乳区有临床症状（肿胀、发热、痛感、潮红）且乳汁外观改变（凝乳块或絮状物、水样外观，颜色变化），并伴有或无一般临床症状（发热、食欲减少）的乳腺炎。

亚临床型（隐性）乳腺炎（Sub-clinical infectious mastitis）：乳腺炎的一种形式，乳房和乳汁肉眼观察无异常，但乳汁理化性质发生变化，乳汁体细胞数明显增加，且细菌学培养存在病原微生物。

体细胞定量计数（Quantitative somatic cell count，QSCC）：利用库氏计数器或电子体细胞计数技术等测定乳汁中的体细胞数。

二、防治乳腺炎产品的靶动物安全性试验（刺激性试验）

**（一）概述**

申报单位必须证明拟上市的用于防治奶牛乳腺炎的产品对靶动物是安全的。下述的安全性试验用于证明受试药对靶动物的安全性。另外，在疗效试验期间，药物发生的任何不良反应也应予以报告。

**（二）受试动物**

1. 用于泌乳期的兽药

选择健康无乳腺炎的经产奶牛和初产奶牛各6头，每组应有半数奶牛（3头）的日产奶量在25kg以上（泌乳早期）、半数奶牛（3头）的日产奶量在15kg以下（泌乳后期）。

对每头受试动物应说明其年龄、泌乳阶段、挤奶次数以及日产奶量情况。

2. 用于干乳期的兽药

选择6头正常经产奶牛（已完成2次及2次以上泌乳的经产奶牛）和6头初产奶牛（完成第一个哺乳期的初产奶牛）。

对每头受试动物应说明其年龄、挤奶次数方面的情况。对经产奶牛要说明前一个泌乳期的产奶量。

**（三）受试药物**

拟用于防治奶牛乳腺炎的制剂。

**（四）给药与采样**

1. 给药前

给药前至少间隔24小时连续2次采集每头牛的4个乳区奶样，分别进行细菌培养鉴定和体细胞定量计数，以确定受试动物是否健康。

2. 给药

在第2次采样后间隔24小时开始按照标明的药物给药方案给药，且每头牛的4个乳区均需给药。

3. 给药后采样

（1）泌乳期产品

对于多次给药的产品，自第二次给药开始，每次给药前采集每头牛的四个乳区奶样，进行体细胞定量计数。并分别在最后一次给药结束后12小时和第7天采样进行细菌培养和体细胞定量计数。

（2）干乳期产品

分别于给药结束后12小时和第7天采集每头牛的4个乳区奶样，进行细菌培养和体细胞定量计数。

**（五）数据收集与结果评价**

一般性信息：包括动物身份的识别信息、试验地点、试验编号、观察日期、测试天数和时间，以及每个受试牛的产奶量和体温。

一般临床观察：每天2次，对每头牛的4个乳区进行检查，并进行触诊，以表明有无肿胀、潮红和疼痛等反应；另外，在每个阶段还要通过定量计数方法测定体细胞数。

根据所收集的上述数据及临床检查结果确定防治乳腺炎产品对靶动物的安全性。

三、防治乳腺炎产品的药物有效性研究

**（一）一般性原则**

对治疗临床型乳腺炎的药物，其用药条件是：动物应存在某种入侵乳房的病原菌、有细胞学反应且牛奶出现异常，或者出现临床症状（如肿胀、潮红和痛感），或者两者同时存在。对治疗亚临床型乳腺炎的药物，其用药条件是：动物应存在某种入侵乳房的病原菌和有细胞学反应。

在临床研究中，乳腺炎致病菌分布情况将用于确定标签的疗效说明。这需要有足够数量的主要乳腺炎致病菌以证明其有效性。

应报告体细胞定量计数结果。该信息将用于检查在各治疗组内“治愈”和“未治愈”奶牛体细胞定量计数平均值之间的变化趋势。

数据收集应来自具有代表性的靶牛群。为此应对靶牛群中所有泌乳或非泌乳奶牛（取决于标签说明中拟用的适应证）进行检查，所有符合条件的奶牛（被感染的奶牛）都应入选至试验中。

应提交牛群/奶牛的一般性描述数据，这些数据包括整个成年牛群的大小、当前泌乳的奶牛数、牛群中被取样的泌乳奶牛数和百分率、感染乳腺炎的泌乳奶牛数和百分率、每头奶牛的大致年龄、品种、当前日产奶量、泌乳次数和泌乳阶段。

在进行亚临床型传染性乳腺炎研究时，建议试验前进行细菌培养/取样调查。试验前的培养或取样检查应包括来自整个牛群中所有泌乳奶牛的全部乳区的奶样，牛群中所有感染乳区应包括在研究中。

确定治疗临床型乳腺炎的复方产品疗效则应按目前对复方药物的要求进行研究，建议申报单位在研发这类产品前有必要对提交数据的要求以及特定复方产品的优点进行分析讨论。

入选的受试动物应无相关抗乳腺炎疫苗的接种史。这些产品包括但并不局限于疫苗、菌苗、免疫调节剂、血清抗体或抗毒素等。

供临床试验的牛群必须有足够数量的临床乳腺炎病例以满足对各组的动物数要求。在开始研究前应详细说明（规定）牛群数和在每个牛群的分组情况。

建议采用盲法研究，并提供所用盲法的详细情况。

**（二）临床试验**

1. 剂量筛选试验（Ⅱ期临床试验）

包括一个对照组和至少3个药物剂量组，其中3个药物剂量组由一个不十分有效的较低剂量组、一个推荐剂量组和一个较高但并不比推荐剂量更有效的剂量组组成。剂量筛选试验应至少在两个奶牛场执行。每个奶牛场每组动物不少于15头。

2. 剂量确认试验（Ⅲ期临床试验）

以剂量筛选试验中确定的有效剂量为基础，试验设计时必须包含一个对照组，最好是阴性对照组。如果未使用阴性对照研究应说明理由。对于原创药物，由于我国各地气候和地域地理条件不同，剂量确认试验应至少在两个地区（南方、北方各一个）进行，并由不同的研究机构实施。每个地区每组动物不少于30头。

3. 评价参数

评价药物有效性的关键参数是用药后的临床反应和细菌学培养结果。研究人员应参照奶牛乳腺炎诊断的微生物学程序进行细菌学培养和鉴定。

**（三）用于泌乳期奶牛临床型乳腺炎的兽药**

1.动物入选标准

（1）试验动物以患有临床型乳腺炎的泌乳期奶牛（如含有凝乳块、絮状物及水样外观的视觉异常乳和/或乳房出现如肿胀、潮红和痛感的临床症状）为单元。一般只有单个乳区患有临床型乳腺炎的奶牛才能被登记用于试验。

（2）在登记入选奶牛时需对临床型乳腺炎（如是否有凝乳块、絮状物、水样外观的异常奶，和/或乳房出现肿胀、发红和疼痛的临床症状）进行诊断。临床型乳房炎由研究者在采样时做出诊断，但在其他时间可由奶牛场的兽医进行评估。

2. 治疗前采样（研究者在治疗前应对牛群进行筛选，以使感染某一病原菌的牛在各治疗组中均匀分配）

（1）在治疗前采集一份乳样进行微生物学检查和体细胞定量计数。测定分离的乳腺炎病原菌最小抑菌浓度（MIC）和MIC临界点，以评估病原菌对新的抗感染药物的敏感性。

（2）采样时应对来自受试乳区的乳样进行临床型乳腺炎症状（如凝乳块、絮状物、水样外观的异常奶）检查。每次挤奶时将阳性结果记录在动物的数据记录表中，并与每次挤奶时的日常检查收集的数据进行汇总。

3. 治疗

只有单个乳区感染的奶牛才被用于治疗试验。在入选试验期间，若奶牛的其它非用药乳区发生乳腺炎，则从试验中剔除该奶牛，但不认为是治疗失败。在评估疗效时应剔除对其他炎症乳区要求和/或接受治疗的奶牛。对照选择包括：试验前后对比、与已批准的对照药物治疗对比。

4. 治疗后采样

在疗效评估期间（治疗后14～28天）各用药的乳区至少要采集2次乳样，并对每份乳样分别进行微生物学检测和体细胞定量计数。2份乳样间的采样间隔时间至少为7天。

5. 疗效的评估

（1）根据给药后7～14天之间对照组的试验结果评价治愈情况。只有在治疗前从乳样中分离出乳腺炎病原菌的临床型乳腺炎病例才能用于计算治愈率。体细胞定量计数仅作为检查各治疗组内“治愈”和“未治愈”奶牛的平均体细胞数之间的变化趋势。

（2）治愈标准：临床上治愈的乳区必须泌乳正常、无临床型乳腺炎症状，且在微生物学分离培养上，治疗前乳样中分离出的乳腺炎病原菌在治疗后采集的奶样中不得再分离出。

（3）来自临床研究的乳腺炎病原菌分布情况将用于确定标签的疗效说明。例如，对葡萄球菌和链球菌性乳腺炎病原菌有效的抗微生物药适应证是：“用于治疗由葡萄球菌属（如金黄色葡萄球菌）和链球菌属（如无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌）细菌引起的临床型乳腺炎”。

**（四）用于泌乳期奶牛亚临床型乳腺炎的兽药**

所有防治泌乳期奶牛乳腺炎的抗微生物药必须对临床型乳腺炎有效，一般不会单独批准仅用于防治泌乳期奶牛亚临床型乳房炎的产品。要获得治疗亚临床型乳腺炎的适应证，则需要另外提供亚临床型乳腺炎的试验数据。

1. 动物入选标准

选择阳性乳区（感染）的奶牛用于亚临床型乳腺炎治疗试验。研究者在采样前应对牛群进行筛选以尽可能使病原菌在各治疗组中平均分配。

2. 治疗前采样

治疗亚临床型乳腺炎产品的研究将是一种随机化研究。在治疗前要求获得2份微生物学和体细胞定量计数检测样本，采样间隔时间至少24小时。

3. 治疗

在亚临床研究中，对任何奶牛只治疗一个乳区。对存在多个乳区感染的奶牛，将随机选择其中的一个感染乳区进行治疗，其他乳区不用药治疗。如果其他乳区因临床型乳腺炎而要求额外治疗时，则应从研究中剔除该奶牛。

4. 治疗后采样

在治疗后14～28天内，采集2次乳样用于微生物学和体细胞定量计数检测。2份乳样的采样间隔时间至少为7天。

5. 治愈的评价标准

（1）在治疗后7～14天期间根据阴性对照组研究结果评估治愈情况。在亚临床治疗研究中，体细胞定量计数结果如临床研究一样只用于检查体细胞数的变化情况。

（2）治疗前从乳样中分离出的乳腺炎病原菌在治疗后采集的乳品中应不得再检出。

（3）依据亚临床研究中获得的有效数据，产品将得到类似下面的适应证说明：用于治疗由葡萄球菌属（如金黄色葡萄球菌）、链球菌属（如无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌）细菌引起的临床和亚临床型乳腺炎。

**（五）用于干乳期奶牛亚临床型乳腺炎的药物**

对拟用于干乳期的药物，有必要分别进行治疗和预防效果研究。治疗将意味着消除干乳期奶牛中已有的感染，而预防则意味着防止干乳期奶牛出现新的感染。

对预防性用药，有必要通过阴性对照组确定新感染比率。

1. 动物入选标准

将进入泌乳后期准备干奶的奶牛纳入试验研究中。

2. 给药前采样

研究者在治疗前1周应从每个乳区采集2次乳样用于微生物分离培养，2次乳样的采样间隔至少为24小时，其中第二份样品在预期干奶的当天采集。其中一份来自给药前的奶牛每个乳区的奶样用于测定体细胞定量计数。

3. 给药

用于干乳期治疗和预防的药物，入选奶牛的所有乳区应在第二次乳样采集后通过乳房灌注给药。

4. 给药后采样

用于干乳期治疗和预防的药物，应在奶牛产犊后1～5天内从每个乳区采集两次样品用于细菌分离培养，两次采样间隔应为24小时。同时测定每个乳区第2份奶样的体细胞定量计数。

5. 疗效的评价标准

（1）对于治疗药物：在再次泌乳时微生物培养应为阴性且无临床症状。

（2）对于预防药物：阳性对照组的，受试药的预防效果应不显著低于阳性对照组的疗效；设阴性对照组的，则受试药组的新增感染率至少降低50%。

（3）体细胞定量计数的结果只用于临床研究中检查体细胞数的变化情况。

四、疗效的判定标准

以下各表所示的给药前和给药后细菌学分离培养结果是本文中所述的采集一份或2份乳样的检测结果。这些组合可外推至其他病原菌。

**（一）用于泌乳期奶牛的产品**

表1 临床型乳腺炎治疗结果

| 给药前培养结果1 | 给药后培养结果2 | 结果判定 |
| --- | --- | --- |
| SA**3** | - | - | - | 对SA治愈 |
| STA**4** | - | - | - | 对STA治愈 |
| SA | SA | - | - | 对SA治愈 |
| SA | SA | STA | STA | 对SA治愈**5** |
| SA | - | STA | STA | 对SA治愈**5** |
| SA | SA | STA | - | 对SA治愈**5** |
| SA | - | STA | - | 对SA治愈**5** |
| STA | STA | - | - | 对STA治愈 |
| STA | STA | SA | SA | 对STA治愈**5** |
| STA | STA | SA | - | 对STA治愈**5** |
| STA | - | SA | SA | 对STA治愈**5** |
| STA | - | SA | - | 对STA治愈**5** |
| SA | SA | SA | SA | 对SA治疗失败 |
| SA | SA | SA | - | 对SA治疗失败 |
| SA | - | SA | - | 对SA治疗失败 |
| STA | STA | STA | STA | 对STA治疗失败 |
| STA | STA | STA | - | 对STA治疗失败 |
| STA | - | STA | - | 对STA治疗失败 |

注释：

1. 对于传染性乳腺炎病原菌（金黄色葡萄球菌和无乳链球菌），只要有一份样品出现阳性培养结果，动物即可入选试验中，对于其他病原菌，给药前的2份样品连续培养均必须为阳性的动物才可入选试验研究。

2. 对于所有病原菌，在治疗后只要有一份样品出现阳性培养结果（与治疗前样品中分离培养出的细菌相同），即为治疗失败。

3. 金黄色葡萄球菌。

4. 无乳链球菌。

5. 在给药前分离出一种病原菌而在给药后分离出另一种不同病原菌的病例应予以记录；这种事件的发生率在最终的试验报告表中应给予表述。

注：应在原始数据表中记录给药前和给药后乳汁异常迹象和乳腺炎的临床症状。

表2 亚临床型乳腺炎治疗结果

| 给药前培养结果1 | 给药后培养结果 2 | 结果判定 |
| --- | --- | --- |
| SA**3** | - | - | - | 对SA治愈 |
| STA**4** | - | - | - | 对STA治愈 |
| SA | SA | - | - | 对SA治愈 |
| SA | SA | STA | STA | 对SA治愈**5** |
| SA | - | STA | STA | 对SA治愈**5** |
| SA | SA | STA | - | 对SA治愈**5** |
| SA | - | STA | - | 对SA治愈**5** |
| STA | STA | - | - | 对STA治愈 |
| STA | STA | SA | SA | 对STA治愈**5** |
| STA | STA | SA | - | 对STA治愈**5** |
| STA | - | SA | SA | 对STA治愈**5** |
| STA | - | SA | - | 对STA治愈**5** |
| SA | SA | SA | SA | 对SA治疗失败 |
| SA | SA | SA | - | 对SA治疗失败 |
| SA | - | SA | - | 对SA治疗失败 |
| STA | STA | STA | STA | 对STA治疗失败 |
| STA | STA | STA | - | 对STA治疗失败 |
| STA | - | STA | - | 对STA治疗失败 |

注释：

1. 对于传染性乳腺炎病原菌（金葡菌和无乳链球菌），只要有一份样品出现阳性培养结果动物即可入选试验中，对于其他病原菌，给药前的两份样品连续培养均必须为阳性的动物才可入选试验研究。

2. 对于所有病原菌，在治疗后只要有一份样品出现阳性培养结果（与治疗前样品中分离培养出的细菌相同）即为治疗失败；

3. 金黄色葡萄球菌；

4. 无乳链球菌；

5. 在给药前分离出一种病原菌而在给药后分离出另一种不同病原菌的病例应予以记录；这种事件的发生率在最终的试验报告表中应给予表述。

**（二）用于干乳期乳腺炎的药物**

表3 治疗干乳期亚临床型乳腺炎结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 给药前培养结果1 | 给药后培养结果 2 | 结果判定 |
| SA**3** | - | - | - | 对SA治愈 |
| STA**4** | - | - | - | 对STA治愈 |
| SA | SA | - | - | 对SA治愈 |
| SA | SA | STA | STA | 对SA治愈**5** |
| SA | - | STA | STA | 对SA治愈**5** |
| SA | SA | STA | - | 对SA治愈**5** |
| SA | - | STA | - | 对SA治愈**5** |
| STA | STA | - | - | 对STA治愈 |
| STA | STA | SA | SA | 对STA治愈**5** |
| STA | STA | SA | - | 对STA治愈**5** |
| STA | - | SA | SA | 对STA治愈**5** |
| STA | - | SA | - | 对STA治愈**5** |
| SA | SA | SA | SA | 对SA治疗失败 |
| SA | SA | SA | - | 对SA治疗失败 |
| SA | - | SA | - | 对SA治疗失败 |
| STA | STA | STA | STA | 对STA治疗失败 |
| STA | STA | STA | - | 对STA治疗失败 |
| STA | - | STA | - | 对STA治疗失败 |

注释：

1. 对于传染性乳腺炎病原菌（金黄色葡萄球菌和无乳链球菌），只要有一份样品出现阳性培养结果，动物即可入选试验中，对于其他病原菌，给药前的2份样品连续培养均必须为阳性的动物才可入选试验研究。

2. 对于所有病原菌，在治疗后只要有一份样品出现阳性培养结果（与治疗前样品中分离培养出的细菌相同），即为治疗失败。

3. 金黄色葡萄球菌。

4. 无乳链球菌。

5. 在给药前分离出一种病原菌而在给药后分离出另一种不同病原菌的病例应予以记录；这种事件的发生率在最终的试验报告表中应给予表述。

表4 预防干乳期亚临床型乳腺炎结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 给药前培养结果1 | 给药后培养结果 2 | 结果判定 |
| - | - | - | - | 未出现新感染 |
| - | - | SA**3** | - | 出现新感染 |
| - | - | - | SA | 出现新感染 |
| - | - | SA | SA | 出现新感染 |
| - | - | STA **4** | - | 出现新感染 |
| - | - | - | STA | 出现新感染 |
| - | - | STA | STA | 出现新感染 |

注释：

1. 对于预防适应证，所有给药前的细菌培养结果应为阴性。

2. 对于所有病原菌，在治疗后只要有一份样品出现阳性培养结果（与治疗前样品中分离培养出的细菌相同），即为治疗失败。

3. 金黄色葡萄球菌。

4. 无乳链球菌。

注：

1. 传染性的亚临床型乳腺炎的预防效果应能使新感染至少应下降50%；

2. 应测定一份来自给药前乳样的体细胞定量计数。