**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（℃）** | **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≥80%或发病率≥80%，不感染不给药对照组存活率≥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。