**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。

**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5×105～5×106 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、60 min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10 min，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106～107 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和对照消毒剂溶液4.5mL内，置20℃水浴5 min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与受试消毒剂和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10 min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：

消毒t时的杀菌率（Pt）=[(n0-nt)/ n0] ×100%

杀灭指数（KI）=n0/nt

以上两式中：n0为对照组活菌数，nt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5 min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%

1. 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105～106CFU/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、60 min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×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、120 min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。

1. **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。

1. **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、x2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，主要用于杀灭外环境中病原微生物的化学药物。

3.抗菌，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。