牛抗蠕虫药临床有效性试验技术指导原则

# 一、概述

## （一）定义与目的

本指导原则适用于牛蠕虫感染的抗蠕虫药物临床有效性评价。牛用抗蠕虫药Ⅱ期临床有效性试验目的是了解不同剂量的受试药物对靶动物的抗蠕虫效果，确定受试药物的治疗作用和剂量范围。牛用抗蠕虫药Ⅲ期临床有效性试验目的是进一步验证受试药物对目标适应证的治疗作用和给药方案，确定受试药物对目标适应证的临床效果，观察受试药物的不良反应和制定防治措施。对偏离本指导原则的试验研究，申请人应予解释说明。

## （二）一般要求

抗蠕虫药拟用的所有寄生虫的每种适应症均需进行临床有效性试验。

在Ⅱ期临床有效性试验中，自身对照试验法在牛中不适用，推荐基于寄生虫成虫和/或幼虫计数的对照试验法。一般采用人工诱发感染病例，条件不允许时也可选择自然感染病例（如牛弓首蛔虫、绦虫和岐腔吸虫尚没有人工感染模型）。药物适应症为针对第四期幼虫的有效性试验，应采用人工诱发感染动物；药物适应症为针对滞育幼虫的有效性试验，应采用自然感染动物。对于罕见寄生虫虫种，可采取人工诱发感染来进行试验。人工诱发感染一般更倾向于选择最新田间分离的蠕虫虫株，最新田间分离株更能准确地反映寄生虫流行和对药物敏感性的实际状况。对于罕见的蠕虫虫种可以使用实验室保存的蠕虫虫株。可以同时用几种确定的寄生虫虫种进行人工诱发混合感染。

在Ⅲ期临床有效性试验中，推荐基于虫卵计数和虫种鉴别的方法对药效进行评价。应采用自然感染病例。

# 试验设计

# （一）试验动物

### 1. 动物选择标准

试验前制定试验动物的选择标准。根据寄生虫生物学特性和药物作用特性选择有代表性的试验动物。一般应从有试验动物资质证明的饲养单位购买；如果没有资质证明，动物应来源清楚、饲养规范；避免使用近期用过抗蠕虫药物的动物（至少在所用药物的7个半衰期内未再用过抗蠕虫药物）。

### 自然感染病例

选用符合受试药物目标适应证的自然感染病例，试验动物应与受试药物申请应用的动物种属相同，品种不限，报告中需注明动物品种、年龄、体重和性别。蠕虫感染种类可以通过检测粪便中的虫卵或幼虫形态特征来确定；对于大部分圆线虫虫卵而言，可以将虫卵培养至第三期幼虫，根据幼虫形态结构特征，确定所感染线虫的属。蠕虫感染种类的确定需要提供相应的照片。

### 人工诱发感染病例

应选择临床健康动物，且与受试药物靶动物在年龄、性别以及种属等方面具有代表性的、体内没有目标寄生虫寄生的健康动物。避免应激（例如饮食不良）因素对寄生虫感染状态造成影响，牛舍条件应不会造成意外感染。

人工诱发感染试验中推荐使用的寄生虫种类与数量：表1所示为不同种属寄生虫感染性幼虫或寄生虫虫卵的推荐感染数量范围。推荐达到充分感染的感染性阶段虫体的最低感染数量。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表1.抗蠕虫药在牛药效试验中建立充分感染所需感染性幼虫或虫卵  的数量范围   |  |  | | --- | --- | |  | | | 寄生虫种属 | 虫卵/幼虫数量范围（条） | | **皱胃** | | | 柏氏血矛线虫 *Haemonchus placei* | 5000~10000 | | 奥氏奥斯特线虫 *Ostertagia ostertagi* | 10000~30000 | | 艾氏毛圆线虫 *Trichostrongylus axei* | 10000~30000 | | **小肠** | | | 肿孔库古柏线虫 *Cooperia oncophora* | 10,000 ~ 30,000 | | 点状古柏线虫 *C. punctate* | 10,000 ~ 15,000 | | 蛇形毛圆线虫 *T. colubriformis* | 10,000 ~ 30,000 | | 钝刺细颈线虫 *Nematodirus spathiger* | 3000~10000 | | 海尔维第细颈线虫 *N. helvetianus* | 3000~10000 | | 巴塔细颈线虫 *N. battus* | 3000-6000 | | 辐射食道口线虫 *Oesophagostomum radiatum* | 1,000 ~ 2,500 | | 微管食道口线虫*O. venulosum* | 1,000 ~ 2,000 | | 绵羊夏伯特线虫 *Chabertia ovina* | 500 ~ 1,500 | | 牛仰口线虫 *Bunostomum phlebotomum* | 500 ~ 1,500 | | 乳突类圆线虫 *Strongyloides papillosus* | 1,000 ~ 200,000 | | 毛尾线虫 *Trichuris spp.* | 1,000 | | **肺** | | | 胎生网尾线虫*Dictyocaulus viviparus* | 500 ~ 6,000 | | **肝** | | | 肝片吸虫（囊蚴）*Fasciola hepatica (metacercaria)* | | | 成年牛 | 1,000 | | 育成牛 | 500~1,000 | |

在最终报告中，应记录用于人工诱发感染的幼虫或虫卵数量，并说明虫种/株的来源。如系实验室保存株，应说明其特性，如来源、保存方法、药物敏感性、传代次数等信息；如系田间分离株，应说明其来源、分离地点和日期、保存方法、对已有驱蠕虫药的暴露情况以及种属鉴定等信息。

### 动物数量

尽管试验动物的数量需要根据统计学原理以获取足够试验数据为依据，但是为了达到协调一致的目的，Ⅱ期临床有效性试验应确保每个适应证每组动物数在试验结束后不少于6头（n≥6），Ⅲ期临床有效性试验应确保每个适应证每组动物数在试验结束后不少于30头（n≥30）。

### 确定建立牛充分感染的幼虫或虫卵数量

蠕虫种、属乃至虫株存在差异，如不同试验虫株感染性和病原性存在差异，充分感染的统一定义不能用公式表示。因此，在制定试验方案时，尤其是考虑统计学、寄生虫学、每个对照动物的感染水平与临床表现的相关性、虫种感染的对照动物数量时，应对充分感染进行定义。试验方案中，必须根据所在试验地区的相关寄生虫病流行情况、流行病史以及现有统计学数据，确定本研究中能建立寄生虫充分感染的感染数量，在试验前对感染动物进行相关检查。试验动物的感染水平及其分布应符合有效性标准，满足生物统计置信度要求。也可采用多重感染，但各蠕虫虫种需达到最低充分感染水平。在对照组所有动物均感染的情况下，计算对照组载虫量几何平均值的95%置信下限值。如果该值大于对照组载虫量几何平均值的10%，则认为是充分感染。当对照组中存在未感染（计数=0）动物时，可用中位值替代几何平均值，并根据对照组载虫量中位值计算95%置信区间。

关于蠕虫充分感染的最小数量，根据统计学、历史数据和文献综述等确定并在最终报告中提交。用于支持标签中所标示的某项适应证成立时，牛充分感染的成虫量，不同的虫种是不同的。一般而言，线虫充分感染所需的平均感染寄生虫数量最低限为100。牛仰口线虫、食道口线虫 、毛尾线虫以及网尾线虫，其平均感染寄生虫数量最低限可能会更低。III 期临床试验中，如果是通过检测粪样的中线虫虫卵的 EPG 值（Eggs per gram，每克粪便中的虫卵数）来选择试验动物，则 EPG 值应大于或等于200。对于片形吸虫来讲，其平均感染寄生虫数量最低限为20条。结合试验动物的病史、寄生虫学检查结果以及统计标准，所有试验牛应是达到充分感染标准的。

### 试验动物管理

试验动物的动物设施、饲养及护理需要严格遵循动物福利原则，包括按照试验场的免疫程序进行疫苗免疫等，应在终期报告中记录相关信息。建议试验动物在抵达试验点后要给与最少7天的适应期。试验过程中，应因地提供充足的饲养空间、饲料和饮水。试验期间，需要每天定时观察试验动物，以及时发现出现的异常表现。

每个试验组的每头动物应当加以标记，疗效评价各项指标按每头动物进行测定，并在最终的报告中标明。

### 受试动物淘汰标准

使用受试药物不足推荐给药疗程的动物、因伴发其他疾病或需要联合用药的动物、或中断试验的动物，均应淘汰。

## （二）试验药物

### 1.受试药物

受试药物应与拟上市的制剂完全一致，有完整的产品质量标准，有合乎规定格式的说明书。受试药物应来源于同一批号，由申报单位自行研制并在GMP验收合格的车间生产的样品。根据法规要求提供符合要求的产品检验合格报告。

### 2.对照药物

对照药物应当是已经在我国批准上市，与受试药物作用相似、适应证相同的药物。由申报单位提供，根据法规要求提供符合要求的产品检验合格报告。

## （三）给药方案

应在预试验或相关文献资料的基础上选择有效剂量的范围，并提供剂量选择依据。

按照受试药物应按照临床推荐的给药方案给药，包括给药方法、给药剂量、多次给药的给药时间间隔和疗程等。对照药物应严格按照其批准的说明书给药。

给药方式为饮水或混饲方式给药，应严格按照标签进行操作。混饲给药需要进行适口性研究。含药的混饮水和混饲饲料均应采样检测，以确定药物浓度。应记录试验中每头试验牛或每组试验牛所消耗的药物量，以确定试验给药剂量符合产品标签推荐的给药剂量。

## （四）试验周期

对于适应证为成虫阶段的药物，治疗不能早于感染后21天~25天；对于大多数虫种来说，最佳治疗时间应在感染后28天~32天。以下虫种除外：食道口线虫（34天~49天）、仰口线虫（52天~56天）、乳突类圆线虫（14天~16天）和片形吸虫（8~12周）。

对于适应证为第四期幼虫阶段的药物，最佳治疗时间因虫种而定，乳突类圆线虫应在感染后3~4天进行治疗，血矛线虫、毛圆线虫和古柏线虫为5~6天，奥斯特线虫和胎生网尾线虫为7天，细颈线虫为8~10天，食道口线虫为15~17天。产品标签上不允许出现“未成熟幼虫”这样笼统的适应症。对于早期未发育成熟的片形吸虫，最佳治疗时间为感染后1周~5周，晚期未发育成熟幼虫感染的最佳治疗时间为感染后6周~9周。

对于自然感染病例，根据蠕虫的生活周期及药物针对的寄生虫生活史阶段，确定抗蠕虫药物的给药时间和试验周期。

## （五）试验分组

所挑选的试验动物随机分组。将试验牛按照体重、性别、年龄和/或暴露于寄生虫的情况进行分组处理，以减少试验结果的变异。也可以通过粪便中虫卵或幼虫计数对试验动物进行随机分组，使各试验动物组之间没有显著性差异。对照组的牛必须与治疗组的牛在品种、年龄、性别、体重和背景上相同。每组试验牛的年龄、性别、体型大小、体重范围等应尽量一致。

1. Ⅱ期临床有效性试验

（1）选用人工感染病例

试验要求分成以下六组：不感染不给药组、感染不给药组、受试药物推荐剂量加倍组、受试药物推荐剂量组、受试药物推荐剂量减半组、药物对照组。

（2）选用自然感染病例

试验要求分成以下五组：感染不给药组、受试药物推荐剂量加倍组、受试药物推荐剂量减半组、受试药物推荐剂量组、药物对照组。

1. Ⅲ期临床有效性试验

选用自然感染病例，一般试验要求分成以下两个组：受试药物组、药物对照组。若无批准的相同适应证的药物，可以去掉药物对照组，增加感染不给药组。

## （六）观察指标

详细观察并记录试验开始前、试验开始后、给药过程中和停药后各个阶段受试动物的生理状态、临床症状，以及症状的发生、发展、消失和转归情况；必要时，检查血液常规指标和血清生化指标；检测与抗蠕虫效果有关的指标，并尽量使用定量指标来评估药效。

1. 临床检查：进行饮水情况、采食情况观察等，观察给药后临床症状的消失和转归情况。
2. 在试验前后观察动物粪便中排出的蠕虫情况。

3. 病理剖检：应对死亡的试验动物进行病理剖检，并进行相关的组织病理学检查，并提供剖检与组织病理学观察的照片，以确定药物的毒副作用以及死亡与药物之间是否存在一定关系。

Ⅱ期临床有效性试验，在末次给药后10天内对所有动物进行剖检，并根据蠕虫感染的特点，对组织或者脏器内的寄生虫进行鉴定和计数，并提供虫体照片。

Ⅲ期临床有效性试验，在试验前后分别检查每只动物每克粪便中虫卵的数量（EPG）等，提供虫卵照片，应保留临床观察结果、生产性能指标和死亡记录，并与购买的饲养单位的历史数据进行比较。

## （七）统计分析

应在试验设计阶段确定拟采用的统计分析方案，如参数统计或非参数统计等。根据试验设计方案选择合适的统计分析程序，如单因素或多因素方差分析等。对受试药物组与对照组（包括不感染不给药对照组、感染不给药对照组或药物对照组）的组内和组间的差异进行显著性检验，确定受试药物的治疗效果及其剂量。

## （八）结果评价

给药组和对照组的寄生虫计数结果需要在统计学具有显著性差异（p<0.05）。临床有效性可采用一些反映治疗效果的寄生虫参数进行评价，包括粪便中虫卵计数和体内虫体计数。无论采用几何平均值还是算术平均值，均能表示有效性的差异。由于虫体数或虫卵数经对数转换比未经对数转换的数值更易趋于正态分布，因此几何平均值比算术平均值更适用于集中趋势的评估，以减少误判。本指导原则要求采用几何平均值计算有效百分率。数据转换为几何平均数后，计算药物的临床有效性，必须达到或者高于90%，方可判定该产品有效。几何平均值是基于对照组所有数据进行计算的，如对照组中计数为零的数据可删除，但相应给药组计数为零的数据则不允许删除。

Ⅱ期临床药物的临床有效性= [（感染不给药对照组虫体数的GM）-（给药组动物虫体数的GM）] ÷[感染不给药对照组虫体数的GM]（GM=几何平均值）×100%。

Ⅲ期临床药物临床有效性：

主要指标：临床有效性= [（给药前虫卵数的GM）-（给药后虫卵数的GM）] ÷[给药前虫卵数的GM]（GM=几何平均值）×100%。

次要指标：临床有效性= [（感染不给药对照组虫卵数的GM）-（给药组动物虫卵数的GM）] ÷[感染不给药对照组虫卵数的GM]（GM=几何平均值）×100%。

# 三、术语

充分感染（adequate infection）：试验方案中确定的自然感染或人工感染水平，即在比较给药动物和对照动物寄生虫学参数（如寄生虫数量）差异时，能够评价药物治疗效果的感染水平。

适应证（claim）：标签上列出的对某种驱蠕虫药敏感（90%或更高的有效性）的寄生虫种或属（成虫和/或幼虫）。

对照试验（controlled test）：采用多个试验组进行药物有效性研究，1个试验动物感染不给药对照组，至少1个试验动物给药组。各给药组和感染不给药对照组的试验动物均为寄生虫充分感染的动物；给药后经一定的时间，将试验动物剖检，对寄生虫进行鉴定和计数。药物的有效性按下式计算：寄生虫成虫或特定发育阶段虫体的驱虫率%=100[（感染不给药对照组虫体数的GM）-（给药组动物虫体数的GM）] ÷[感染不给药对照组虫体数的GM]（GM=几何平均值）。当样本数量相同时通常采用此计算方法。

有效性（effectiveness）：制造商在标签上声明且有充分数据支持的有效程度，即基于对照试验混池数据按几何平均值计算得到的值，具有至少90%的效果。

实验室虫株（laboratory strain）：从田间分离至少10年且在实验室完成特性鉴定和分离的蠕虫亚群。根据一定生物学特性分离的群体，在研究领域有其独特性，如对某一或某些驱虫药的耐药性。

田间分离虫株（field isolate）：从田间分离不到10年，用于药物有效性试验的蠕虫亚群。作为目前田间寄生虫感染的代表性蠕虫株，已进行特性鉴定（含来源、日期、地点、已有驱蠕虫药的暴露情况和保存方法等内容）。

罕见寄生虫（rare parasite）：流行率较低的寄生虫虫种，不会引起重度发病和临床症状，通常局限于特定地理区域。