羊（山羊、绵羊）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

本指导原则适用于羊（山羊、绵羊）蠕虫感染的抗蠕虫药物临床有效性评价。羊（山羊、绵羊）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剂量。羊（山羊、绵羊）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，申请人应进行解释说明。

## （二）一般要求

原则上，抗蠕虫药拟用的所有寄生虫的每种适应证均需进行临床有效性试验。

在Ⅱ期临床有效性试验中，由于自身对照试验法在反刍动物中不可靠，故只接受基于寄生虫成虫和/或幼虫计数的空白对照试验法，应包含寄生虫成虫和/或幼虫的情况，并且需要说明何时使用滞育期幼虫。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，如某种寄生虫感染模型仍未建立（如原圆线虫、绦虫和双腔吸虫），可以采用自然感染病例代替人工诱发感染的方法。药物适应证为针对第四期幼虫的有效性试验，必须采用人工诱发感染的动物；而药物适应证为针对滞育幼虫的有效性试验，只能采用自然感染的动物。幼虫阶段的研究只能使用人工诱发感染动物。对于罕见寄生虫种类，也只能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野外分离的蠕虫株进行诱导感染，因为最新野外分离株更能准确地反映寄生虫的流行和对药物敏感性的实际状况。对于罕见的蠕虫种类可以使用实验室保存的蠕虫株进行诱导感染。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，这样在同一个试验中可以同时研究该药物对多种寄生虫的有效性。

在Ⅲ期临床有效性试验中，推荐使用虫卵计数和/或幼虫计数对药效进行评价。在Ⅲ期临床有效性试验中，应采用自然感染病例。

缓（控）释剂药物也应遵循与其他普通抗蠕虫药相同的评价程序。

山羊、绵羊应分别进行试验。

# 二、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。经口给药的受试药物所用的试验动物应具备自行反刍的能力，且年龄大于3个月。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。避免使用近期用过相关驱虫药物（距离上次所用抗蠕虫药物的7个半衰期内未再次用过抗蠕虫药物）的动物、患过传染病或可能过敏或中毒的动物。

### 2.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，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、体重、性别和年龄。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；或者从候选养殖场挑选3～5头有蠕虫感染的羊，进行系统剖检，分离出体内的成虫，进行蠕虫虫种的鉴定。蠕虫感染种类的确定需要提供相应的照片。

### 3.人工诱发感染病例

试验动物的临床表现应无任何疾病症状，并且可以代表该受试驱虫药所适用动物的年龄、性别以及种属。所有试验中的试验动物在治疗前至少2周内必须室内饲养，以防再次感染。

在人工诱发感染试验中，应使用体内无寄生虫寄生的试验动物。如果该试验动物的饲养环境不能保证是无寄生虫环境，则试验前进行一定时间的驱蠕虫治疗，所用驱虫药的化学成分不能与试药有关，并且需要通过粪便检查来判断动物体内寄生蠕虫是否被清除彻底。

人工诱发感染试验中推荐使用的寄生虫感染数量：试验中实际的寄生虫感染量只是一个大概数字，而且需要根据不同的分离虫株进行调整。综合统计学数据、试验动物的病史、文献综述等决定试验动物充分感染的所需最少寄生蠕虫量，并在最终报告中提交。表1为在现有试验动物模型中推荐的不同种属寄生虫感染数量范围。推荐使用能够达到充分感染所需的最低数量的感染性阶段虫体。

表1 羊抗蠕虫药临床有效性研究中达到充分感染所需的虫卵/幼虫感染数量的范围

|  |  |
| --- | --- |
| 寄生虫种属 | 虫卵/幼虫数量范围（条） |
| 皱胃 | |
| 捻转血矛线虫 *Haemonchus contortus* | 400~4000 |
| 环纹背带线虫 *Teladorsagia circumcincta* | 6000~10000 |
| 艾氏毛圆线虫 *Trichostrongylus axei* | 3000~6000 |
| 小肠 | |
| 柯氏古柏线虫 *Cooperia curticei* | 3000~6000 |
| 蛇形毛圆线虫和透明毛圆线虫 *T. colubriformis & T. vitrinus* | 3000~6000 |
| 细颈线虫*Nematodirus* spp. | 3000~6000 |
| 食道口线虫 *Oesophagostomum* spp. | 500~1000 |
| 绵羊夏伯特线虫 *Chabertia ovina* | 800~1000 |
| 羊仰口线虫 *Bunostomum trigonocephalum* | 500~1000 |
| 乳突类圆线虫 *Strongyloides papillosus* | 80000 |
| 厚肋盖格线虫 *Gaigeria pachyscelis* | 400 |
| 毛尾线虫（鞭虫） *Trichuris* spp. | 1000 |
| 肺 | |
| 丝状网尾线虫 *Dictyocaulus filaria* | 1000~2000 |
| 肝 | |
| 肝片形吸虫（囊蚴）*Fasciola hepatica (metacercaria)* | |
| 慢性 | 100~200 |
| 急性 | 1000~1500 |

在最终报告中，必须包括所有使用过的人工诱发感染的寄生虫相关记录和照片，说明试验中用于人工诱发感染的寄生虫的历史背景。应说明所用的每一种实验室分离株的特性，如来源、保种方法、药物敏感性、培养方法、传代次数和对宿主的感染速度等。对于野外分离株，同样需要说明来源、日期、分离地点、对已有驱蠕虫药的暴露情况和保存方法等信息。

### 4.动物数量

尽管试验动物的数量需要根据统计学原理来计算获得，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项适应证每组不少于（含）6只（n≥6），Ⅲ期临床有效性试验应确保每项适应证每组不少于（含）60只（n≥60）。

### 5.确定羊（山羊、绵羊）充分感染的虫量

因为评价试验用蠕虫的属、种、虫株存在差异，且不同试验株也可能具有不同的易感性和病原特性，所以充分感染的定义不能用统一的公式表示。因此，在制定研究方案时，尤其是在统计学、寄生虫学、每个对照动物的感染水平与临床表现的相关性、每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，确定本研究中能产生寄生虫充分感染的感染数量，并在试验前应对感染动物进行检查。试验动物的感染水平及其分布应符合有效性标准，满足统计和生物置信限的要求。也可采用多重感染，但每种蠕虫均需达到最低感染水平。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动物（计数=0）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%置信限。

用于支持标签中所标示的某项适应证成立时，所考虑的羊（山羊、绵羊）寄生蠕虫（成虫）数量范围可因不同虫体种属的不同而有所差异。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，但仰口线虫、食道口线虫、鞭虫、厚肋盖格线虫以及丝状网尾线虫充分感染所需的平均感染寄生虫数量低限可能会降低。对于片形吸虫，平均感染寄生虫数量最低限达到20即可认为充分感染。结合试验动物的病史、寄生虫学检查结果以及统计标准，所有试验羊（山羊、绵羊）应感染过足量的寄生虫。

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300。

### 6.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照动物福利的要求来进行，包括按照试验场的免疫程序进行疫苗免疫等，并在最终报告中记录相关信息。建议给予试验动物至少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，及时发现药物相关的不良反应或副作用。

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。

### 7.病例淘汰标准

未按推荐疗程给药的动物；因伴发其他疾病或需要联合用药，或中断试验的动物，均应予以淘汰。

## （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剂量范围，并提供剂量选择依据。

按照受试药物拟在临床推荐的给药方案给药，包括给药方法、给药剂量、多次给药的给药间隔时间和疗程等。对照药物应严格按照批准的说明书给药。

给药途径（口服给药、非胃肠道给药、外用药和缓释药物等）、药物剂型和药物的其他活性作用均会影响试验方案的设计。对于外用制剂，建议在考察体外给药的有效性时，应考虑天气与动物之间的关系。缓释药物的整个药物释放过程中，建议的检测时间点均需要对药物的效果进行评价，除非在整个治疗过程中，试验动物的血药浓度在建议治疗时间内的每个检测点的结果显示均处于稳态。

对于混饲给药的，需要对产品适口性/采食量进行研究。加药后的饮水和或混药后的饲料均应采样检测，检测后验证样品中的药物浓度。应记录试验中每只试验羊（山羊、绵羊）所消耗的药物量，以确定试验治疗剂量是否符合标签所推荐的治疗剂量。对于外用药物，在评价药物有效性时，应考虑当地的气候环境（如紫外线强度、降雨）和试验动物的被毛厚度。

## （四）试验周期

对于适应证中作用于成虫阶段的药物，一般规定为，治疗不能早于每种蠕虫的潜在（隐）期（prepatent period），一般在感染后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（绵羊28天～41天；山羊34天～49天）、绵羊夏伯特线虫（49天）、羊仰口线虫（52天～56天）、乳突类圆线虫（14天～16天）和片形吸虫（8周～12周）。

对于适应证中作用于第四期幼虫或未成熟吸虫阶段的药物，最佳治疗时间因虫种而定，例如，乳突类圆线虫应在感染后3天～4天进行治疗，血矛线虫、毛圆线虫和古柏线虫为5天～6天，环纹背带线虫为7天，细颈线虫为8天～10天，食道口线虫为15天～17天。标签上不允许出现“未成熟幼虫”这样笼统的适应证。对于早期未成熟片形吸虫，最佳治疗时间为感染后1周～4周，晚期未成熟幼虫最佳治疗时间为感染后6周～8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

试验动物应随机分组。根据试验动物的体重、性别、年龄和/或暴露于寄生虫的情况进行随机分组，有助于减少系统误差。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。各试验组的羊（山羊、绵羊）在体重、年龄、品种、性别和背景上相同。每组试验动物的年龄、体型大小、体重范围、性别等应尽量一致。

1.Ⅱ期临床有效性试验

（1）选用人工诱发感染病例

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。

2.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。用精计驱虫率判断受试药物的有效性。

## （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，检测血液常规指标和生化指标；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：进行临床全身检查，包括体温、呼吸、心率、可视黏膜颜色、饮水情况、采食情况、粪便、尿液情况观察等，一般也作血液常规和生化指标（尤其是肝功能、肾功能等）检查，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

应在数据分析前的方案设计阶段确定所采用的统计分析类型，如参数统计或非参数统计。选择合适的统计分析程序，对数据进行分析。将受试药物组间、受试药物组与对照组（包括不感染不给药组、药物对照组或感染不给药组）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

治疗组和感染不给药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虫体计数以及体内虫体计数。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。药物的临床有效性标准（大于等于90%）是基于试验动物寄生虫的清除率来制定的。但是如果该药物的治疗目的在于防止某些胃肠道寄生蠕虫污染该地区的牧草，根据动物流行病学原理，其有效率标准水平应适当上调。

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

Ⅲ期临床药物临床有效性包括：

临床有效性= [（给药前虫卵数的GM）-（给药后动物虫卵数的GM）] ÷[给药前虫卵数的GM]（GM=几何平均值）×100%。

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

# 三、术语

充分感染（adequate infection）：在试验方案中定义的自然感染或人工感染水平，当比较给药动物和感染不给药动物的寄生虫参数（如寄生虫数量）时，用以评价药物的治疗有效性。

适应证（claim）：标签上所列的对某种驱蠕虫药敏感（90%或更高的有效性）的寄生虫种属（成虫和/或幼虫）。

空白对照试验（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：寄生虫或特定生命期的驱虫率%=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=几何均数）。当样本数量相同时通常采用此计算方法。

自身对照试验（critical test）：试验动物给药后排出的寄生虫虫体数，加上尸检时肠道内虫体数作为给药期间动物体内寄生虫的总数。如有效性试验按下式计算：各试验动物的有效性%=[排出的虫体数]÷[（排出的虫体数）+（残存的虫体数）]。

有效性（effectiveness）：标签上生产商声称的、已有数据支持的有效程度，即空白对照试验的统计数据按几何平均值计算时，有效性至少达到90%。

实验室虫株（laboratory strain）：从田间分离至少10年，已在实验室进行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。

罕见寄生虫（rare parasite）：流行性较低的寄生虫种属，不会大规模的发病和出现临床症状，通常在特定的地理区域发病。

地区（region）：按气候、饲养的靶动物和寄生虫耐药性情况等定义的地理区域。

潜在（隐）期（prepatent period）：在蠕虫，指寄生虫在体内发育为有繁殖能力的成虫所需的时间。一般是指从寄生虫感染到粪便中检出虫卵的天数。