

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2339—2013

农药登记用杀蚴剂药效 试验方法及评价

Efficacy test methods and evaluation of cercaria-killing for pesticide registration

2013-05-20 发布

2013-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：农业部农药检定所、江苏省血吸虫病防治研究所。

本标准主要起草人：戴建荣、李贤宾、朱春雨、张佳、王晓军、张宏军、张文君。

农药登记用杀蚴剂药效试验方法及评价

1 范围

本标准规定了日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)尾蚴杀蚴剂室内和模拟现场药效试验方法和药效评价指标。

本标准适用于农药登记用杀蚴剂的效果评价。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

日本血吸虫尾蚴 cercaria

日本血吸虫生活史的一个阶段,由体部和尾部组成;尾蚴感染终宿主后发育成熟为日本血吸虫成虫。

2.2

感染性钉螺 infected *Oncomelania* snail

这里仅指能逸出日本血吸虫尾蚴的钉螺。

2.3

虫负荷 worm burden

小鼠体内感染日本血吸虫成虫的数量。

3 仪器设备

3.1 体式显微镜:放大倍数不低于10倍。

3.2 塑料杯:直径7 cm~10 cm,高10 cm圆柱形带盖塑料杯,杯盖开有直径0.5 cm的通气孔3个~5个。

3.3 玻璃缸:50 cm×25 cm×25 cm矩形玻璃缸。

3.4 铁丝笼:用铁丝制成长方体网格型鼠笼,鼠笼规格为45 cm×7 cm×7 cm,隔成5格,周边网格孔径<1 cm。鼠笼的两端有可调挂钩,使测定鼠笼可挂于玻璃缸上,让小鼠腹部和尾部接触到缸中水面。

3.5 培养板:24孔或16孔培养板。

3.6 移液器或微量移液管:0.1 μL~200 μL。

3.7 医用乳胶手套。

4 试剂与材料

4.1 生物试材

4.1.1 日本血吸虫尾蚴:将30只~50只日本血吸虫感染性钉螺,放入100 mL的烧杯中,上盖尼龙沙网,倒入28℃脱氯水至淹没沙网,在白炽灯下逸蚴2 h,获得尾蚴备用。

4.1.2 实验小鼠:选取体重(20±2)g清洁级小鼠,在卫生纸为垫料的饲养盒中饲养1 d以上,去除小鼠皮肤可能沾有的松油后备用。

4.1.3 感染性钉螺:获取50只以上日本血吸虫感染性钉螺,在钉螺饲养盘中28℃饲养7 d以上待用。

4.2 试验药剂

原药与制剂。

4.3 对照药剂

选择已登记的常用药剂。

4.4 空白对照

脱氯自来水。

5 试验条件与方法

5.1 试验条件

温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，相对湿度为 $(60 \pm 5)\%$ 。

5.2 杀蚋活性测定

根据药剂特性，水溶性药物直接用脱氯水稀释，非水溶性药物选用适当的助剂进行稀释，将试验药剂配制成5个~7个等比浓度。在培养板的各孔中加入2 mL脱氯水，用接种环吊取新逸出的日本血吸虫尾蚴10条~30条放入培养孔中，然后在各孔中分别滴入上述各浓度药液10 μL ，设对照药剂组和空白对照组，每浓度组处理3孔以上，用针刺法观察尾蚴的死亡情况，记录5 min和30 min尾蚴死亡数，计算 LC_{50} 值。试验不少于3次重复。

5.3 杀蚋感染试验

设3个待测药剂剂量组，1个对照药剂组和1个空白对照组。将30 mL脱氯水倒入圆柱形带盖塑料杯，移入200条刚逸出的日本血吸虫尾蚴，分别将上述各剂量组药液施于水体表面，在用药后0.5 h，每个杯内放入1只实验小鼠并加盖，0.5 h后，将小鼠移入饲养盒内，分组常规饲养，35 d后按鼠解剖法解剖收集血吸虫虫体，计数检获成虫数，计算感染率下降率和虫负荷下降率。每个剂量组10只鼠。试验不少于3次重复。

5.4 模拟现场试验

设3个待测药剂剂量组，1个对照药剂组和1个空白对照组。取50 cm×25 cm×25 cm矩形玻璃缸10只，分别注入28℃脱氯水20 L，然后在各缸中放置10只~20只感染性钉螺，1 h后分别将上述各剂量组药液施于水体表面，在用药后0.5 h和2 h，分别将装有10只小鼠的铁丝笼悬浮于水体表面，使得小鼠腹部和尾部接触水面0.5 h后将小鼠移入饲养盒内分组常规饲养，35 d后按鼠解剖法解剖收集血吸虫虫体，计数检获成虫数，计算感染率下降率和虫负荷下降率。试验不少于3次重复。

6 数据统计与分析

6.1 将试验数据按式(1)和式(2)计算各处理的死亡率或校正死亡率。计算结果均保留到小数点后两位。

$$P = \frac{\sum K_i}{\sum N_i} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

P ——死亡率，单位为百分率(%)；

$\sum K_i$ ——表示死亡尾蚴数，单位为只；

$\sum N_i$ ——表示处理总尾蚴数，单位为只。

$$P_1 = \frac{P_t - P_0}{1 - P_0} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

P_1 ——校正死亡率,单位为百分率(%);
 P_t ——处理死亡率,单位为百分率(%);
 P_0 ——空白对照死亡率,单位为百分率(%)。

若空白对照死亡率<5%,无需校正;空白对照死亡率在 5%~10%,应按式(2)进行校正;空白对照死亡率>10%,试验需重新进行。

6.2 感染率按照式(3)计算。

$$P_t = \frac{C_t}{N_t} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中:
 P_t ——感染率,单位为百分率(%);
 C_t ——实际观察到感染血吸虫的小鼠数量,单位为只;
 N_t ——实际观察的小鼠总数,单位为只。

6.3 感染率下降率按照式(4)计算。

$$P_{0-t} = \frac{P_0 - P_t}{P_0} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

式中:
 P_{0-t} ——感染率下降率,单位为百分率(%);
 P_0 ——观察期内空白对照组小鼠感染率;
 P_t ——观察期内用药组小鼠感染率。

6.4 平均虫负荷按照式(5)计算。

$$n = \frac{\sum K_i}{\sum N_i} \dots\dots\dots (5)$$

式中:
 n ——平均虫负荷;
 $\sum K_i$ ——表示观察组收集日本血吸虫总虫数,单位为只;
 $\sum N_i$ ——表示观察组小鼠总数,单位为只。

6.5 虫负荷下降率按照式(6)计算。

$$P_{0-i} = \frac{n_0 - n_i}{n_0} \times 100 \dots\dots\dots (6)$$

式中:
 P_{0-i} ——虫负荷下降率,单位为百分率(%);
 n_0 ——观察期内空白对照组平均虫负荷;
 n_i ——观察期内用药组平均虫负荷。

采用几率值分析的方法对数据进行处理。可采用 SAS 统计分析系统、POLO 等软件进行统计分析,求出 LC_{50} 值及其 95%置信区间。

7 药效评价指标

测试药物推荐应用剂量各试验结果均达到评价指标的为合格产品(表 1)。

表 1 药效评价指标

方法	评价指标
杀蚴感染试验	推荐应用剂量感染率下降≥85%
	推荐应用剂量虫负荷下降≥95%

表 1（续）

方法	评价指标
模拟现场试验(0.5 h 和 2 h)	推荐应用剂量感染率下降 $\geq 80\%$
	推荐应用剂量虫负荷下降 $\geq 90\%$

8 结果与报告编写

根据 LC_{50} 、感染率、感染率下降率、虫负荷下降率统计结果进行分析评价, 写出正式试验报告, 并列出原始数据。

附 录 A
(规范性附录)
杀蚴剂药效调查方法

A.1 针刺法

试验时将尾蚴置于解剖镜下观察,用解剖针轻刺尾蚴,尾蚴活动良好者为活蚴,不活动或有软体肿胀、断尾、透明化的为死亡尾蚴或丧失入侵能力的尾蚴。

A.2 鼠解剖法

用镊子将处死后的小鼠腹部皮肤提起,用剪刀剪开腹壁,打开腹腔,观察小鼠肝脏有无日本血吸虫虫卵沉着引起的肉芽肿,观察肝门静脉、肠系膜静脉有无血吸虫成虫。若发现成虫,则将内脏取出放入平皿中,加入生理盐水,分离检出所有血吸虫成虫,解剖镜下观察并计数。
