

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

## 化学农药 鸟类急性经口毒性试验准则

### 第2部分：经典剂量效应法

Chemical pesticide—Guideline for avian acute oral toxicity test Part 2:  
Classical dose-response method

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx实施

中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：农业农村部农药检定所。

本标准主要起草人：

# 化学农药 鸟类急性经口毒性试验准则 第2部分：经典剂量效应法

## 1 范围

本标准规定了用经典剂量效应法测定鸟类急性经口毒性的概述、试验方法、试验程序、数据处理、质量控制以及试验报告等的基本要求。

本标准适用于化学农药，生物化学农药和植物源农药可参照执行，不适用于微生物农药。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

NY/T 2882.3 农药登记 环境风险评估指南 第3部分：鸟类

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**半致死剂量** median lethal dose

给予受试鸟被试物后，可引起50%受试鸟死亡的毒物统计学剂量，用LD<sub>50</sub>表示。

注：单位为mg a.i./kg<sub>体重</sub>或mg/kg<sub>体重</sub>。

## 4 试验概述

将被试物按设计剂量经口灌喂至受试鸟嗉囊或腺胃，定期观察受试鸟的中毒与死亡情况，计算被试物对受试鸟的LD<sub>50</sub>、置信区间和剂量-效应曲线斜率。

## 5 试验方法

### 5.1 受试鸟选择

受试鸟应满足以下要求：

——物种宜选择吐食习性低的鸟类，如鸡形目的日本鹌鹑（*Coturnix japonica*）或山齿鹑（*Colinus virginianus*）；为开展物种敏感性分布，可选择雁形目的绿头鸭（*Anas platyrhynchos*）、鸽形目的原鸽（*Columba livia*）、雀形目的斑胸草雀（*Taeniopygia guttata*，曾用名：*Poephila guttata*）、鸚形目的虎皮鸚鵡（*Melopsittacus undulatus*）等鸟类；

——受试鸟在本实验室中的自然死亡率应≤1%；

——应选择人工繁育的鸟类，不应使用野生鸟类；

——受试鸟应为不处于繁殖期的成鸟；

——宜使用野生表型的鸟类，不能使用野生表型时应选择不同表型杂交的鸟类；

——受试鸟应为同一来源、同一繁殖种群，宜定期远亲交配以保持遗传异质性；

- 受试鸟的日龄应大致相同（±1周）；
- 受试鸟的体重不应超过该种群平均体重的±10%。

## 5.2 受试鸟驯养和试验条件

对斑胸草雀等群居物种，鸟笼应紧靠在一起，其他物种也宜将鸟笼紧靠在一起。每只鸟最小栖息面积为：原鸽 3333 cm<sup>2</sup>、绿头鸭 2000 cm<sup>2</sup>、日本鹌鹑和山齿鹑 1000 cm<sup>2</sup>、斑胸草雀和虎皮鹦鹉 500 cm<sup>2</sup>。鸟笼底部应为网状结构，网眼大小应能使粪便落下且不应影响鸟类活动。原鸽、斑胸草雀和虎皮鹦鹉的鸟笼中应设置栖木。

试验可在人工控制的环境下进行，也可在环境温度和湿度下进行。日本鹌鹑、山齿鹑和绿头鸭的试验温度应为 15 °C~27 °C，但试验期间波动应尽可能小。受试鸟饲养和观察室内应通风良好，空气每小时至少交换 10 次。日本鹌鹑、山齿鹑和绿头鸭每日光照时间为 8 h，其他鸟类可延长至 10 h。应提供充足的饲料和水，并及时更换。可使用商品饲料和维生素，但应符合所用物种的营养需求。试验期间和给药前 14 d 应避免药物治疗。饲料和水应定期测定重金属（如砷、镉、铅、汞、硒等）和持久性农药（如有机氯农药等）等污染物。

## 5.3 受试鸟准备

每只受试鸟均应有单独标识。试验开始前应在试验条件下预养至少 14 d，预养期间死亡率>5%的鸟类不应用于试验。

## 5.4 受试鸟数量

正式试验和限度试验中，处理组和对照组每组至少使用 10 只鸟，通常雌雄各半。当研究特定被试物在特定场所对鸟类的影响时，可根据研究目的确定受试鸟的性别和年龄（例如，农药使用方法表明可能存在风险时，可使用繁殖期的雌鸟）。每个处理组（含对照组）应使用同样数量的受试鸟。

受试鸟应随机分配至各处理组和对照组。同一处理组的受试鸟可分为两笼饲养、每笼 5 只，宜按性别分组。随机分配可在驯养前进行，也可在给药前称重时进行，宜在给药前称重时进行以避免额外的胁迫。

## 5.5 给药

被试物置于胶囊中或溶解、分散于合适的载体后，经口灌喂至受试鸟嗉囊或腺胃；对于液体制剂，也可直接经口灌喂至受试鸟嗉囊或腺胃。当被试物可被水溶解或分散时，应首先考虑使用水作为载体，其次可考虑溶解或乳化于玉米油等食用油中，均不可行时再考虑其他载体。使用水以外的载体时，应了解载体的毒性，载体不应引起吐食。

每只鸟的给药剂量应根据给药前 24 h 内该鸟所测个体体重确定。给药体积应尽量小，不应超过 1 mL/100 g 体重，处理组和对照组的所有受试鸟的给药体积/体重比应相同。给药前一晚受试鸟应禁食 12 h~15 h，日本鹌鹑等较大的受试鸟宜整夜禁食，体重≤50 g 的受试鸟应禁食 2 h。

注：可用食用色素亮蓝（CAS：3844-45-9）等与粪便颜色明显不同的无毒染料使饲料染色，以观察是否出现吐食现象。吐食可能与给药技术或被试物性质有关，减少给药体积、使用胶囊或更换载体可能消除或降低吐食频率。特别是使用雀形目鸟类时，宜先进行预试验来评估受试鸟的吐食习性，如果仍然存在吐食现象应考虑更换另一种鸟类。受试鸟存在吐食现象时不能精确计算出 LD<sub>50</sub>，仅能得出被试物的 LD<sub>50</sub> 大于引发吐食和死亡的最低剂量。

## 5.6 观察

给药后按以下要求确定观察频率和时间：

- 给药后 0 h~2 h 应持续观察受试鸟的中毒症状及是否出现吐食；
- 给药后 2 h~1 d 应在光照期内至少等间隔观察 3 次中毒症状；
- 给药后 2 d~14 d 每日应至少观察 1 次中毒症状；
- 给药后 14 d 仍能观察到中毒症状或死亡时，应延长观察时间至无中毒症状。

应观察记录每只受试鸟的吐食、中毒症状及缓解表现、异常行为、体重，受试鸟出现死亡时应记录死亡时间。

物理损伤等明显不是被试物导致的偶然死亡应在结果计算中排除。

应在给药前（确定给药剂量时）及给药后 3 d、7 d 和 14 d 测定受试鸟的体重；给药后 0 d~3 d 应每日测定食物消耗量，其后应测定 3 d~7 d 和 7 d~14 d 的食物消耗量。若延长观察时间，最后一次体重和食物消耗量应在试验结束时测定。建议给药前 7 d 额外测定一次受试鸟体重以提供基线数据。

试验结束时所有死亡受试鸟应进行大体解剖，还应从处理组未死亡受试鸟中随机选取足够数量进行大体解剖。对照组未死亡受试鸟应至少随机选择 3 只进行大体解剖。处理组和对照组均未出现死亡和中毒症状时可不解剖。

试验期间，受试鸟有明显的疼痛或处于濒死状态（按附录 A 判断）时，经试验项目负责人评估继续观察不能得出对试验有用的信息时，应实施安乐死并计入死亡数。

## 6 试验程序

### 6.1 预试验

应开展预试验确定正式试验的给药剂量，当已知被试物的大致毒性时可不开展预试验。按正式试验的条件，用少量受试鸟以较大的间距设置 3 个~5 个处理组，建议设置为 2 mg 被试物/kg 体重、20 mg 被试物/kg 体重、200 mg 被试物/kg 体重和 2000 mg 被试物/kg 体重，给药后观察并记录鸟类中毒症状和死

亡情况。

## 6.2 正式试验

正式试验应至少设置 5 个处理组和 1 个对照组。处理组应按一定的几何级数设置，以充分描述整个剂量-效应曲线。至少应有 3 个处理组的受试鸟死亡率介于 0% 和 100% 之间。给药后按 5.6 观察并记录受试鸟中毒症状和死亡情况。

## 6.3 限度试验

对毒性可能较低的被试物，宜开展限度试验。限度试验设置 1 个处理组和 1 个对照组。限度剂量为 2000 mg 被试物/kg 体重或按 NY/T 2882.3 计算出的鸟类  $PED_{acute}$ （取高值）。给药后按 5.6 观察并记录受试鸟中毒症状和死亡情况。若处理组受试鸟均未死亡，表明在 95% 置信水平下被试物的  $LD_{50}$  > 限度剂量，试验可终止。

## 7 数据处理

### 7.1 环境条件

应计算试验期间温度和湿度的平均值、标准偏差、相对标准偏差、最小值和最大值。

### 7.2 死亡数

应以表格形式给出各处理组和对照组每次观察的累积死亡数。若同时使用了雌鸟和雄鸟，应分别提供。

### 7.3 体重

按式 1 计算每只受试鸟在两次称重期间的体重变化和试验期间的总体重变化。应计算出各处理组和对照组在各次称重期间及试验期间体重变化的平均值和标准偏差。若同时使用了雌性和雄性受试鸟，应分别提供。

$$d_{i-j} = w_j - w_i \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$d_{i-j}$ ——第 i 和第 j 次称重期间的受试鸟体重变化，单位为 g（克）；

$w_j$ ——第 j 次称重时的受试鸟体重，单位为 g（克）；

$w_i$ ——第 i 次称重时的受试鸟体重，单位为 g（克）。

### 7.4 食物消耗量

应计算各处理组和对照组受试鸟在各次观察期间和试验期间的平均食物消耗量。

### 7.5 中毒症状

应以表格形式给出各处理组和对照组在每次观察时出现中毒症状的受试鸟数量，若同时使用了雌鸟和雄鸟，应分别提供。同时，记录存活受试鸟的中毒症状恢复和异常行为停止情况。

## 7.6 大体解剖

应以表格形式给出各处理组死亡或存活受试鸟大体解剖的数量及观察到的病理类型，若同时使用了雌鸟和雄鸟，应分别提供。

## 7.7 死亡率

试验结束时应计算处理组和对照组的累积死亡率。对照组出现死亡时，应计算校正死亡率。

## 7.8 剂量效应曲线、斜率和 LD<sub>50</sub>

使用合适的统计方法计算 LD<sub>50</sub>、置信限和剂量效应曲线斜率，宜使用多元概率比回归模型（probit 模型）计算 LD<sub>50</sub> 和斜率，宜使用 Fieller 定理、似然比法或二项式法计算 LD<sub>50</sub> 的置信区间。

试验报告中应提供回归模型拟合度的指标描述。

## 8 质量控制

质量控制条件包括：

- 受试鸟应随机分配至各处理组和对照组；
- 对照组受试鸟死亡率不应>10%；
- 每个处理组和对照组至少使用 10 只受试鸟；
- 正式试验至少设置 5 个处理组和 1 个对照组。

## 9 试验报告

试验报告至少应包括以下内容：

### a) 被试物：

- 通用名、化学名、化学文摘登录号（CAS 号）、结构式、纯度；
- 来源、批号、有效期、稳定性；
- 物理性状、水中溶解度及其他相关的理化性质。

### b) 试验方法和试验体系：

- 试验类型；
- 受试鸟的物种、品系、来源、日龄、体重及健康状况；
- 试验方法的详细描述。

### c) 试验过程：

- 试验浓度设计（处理组和重复的数量）；
- 受试鸟驯养时间和分配程序；
- 给药方法（是否采用胶囊、采用的载体、单位体重给药体积）；
- 受试鸟饲养条件（鸟笼的规格和材料、温度、湿度、光照时间、光照强度）；

- 饲料和饮用水（适用性、标识、来源、组成、热量值、污染物测定结果）；
- 观察的频率、时间和方法（健康/死亡、体重、食物摄入量）；
- 统计方法。

d) 试验结果：

- 死亡（死亡时间、中毒症状）；
- 分别以  $\text{mg a.i./kg 体重}$  和  $\text{mg 被试物/kg 体重}$  计的  $\text{LD}_{50}$ 、剂量-效应曲线的斜率、置信区间；
- 症状出现和终止的时间（记录时间应精确到分钟）；
- 大体解剖病理检查结果；
- 每只受试鸟的体重数据；
- 饲料消耗量数据。



附录 A  
(规范性附录)

受试鸟明显疼痛和濒死状态的判定

A.1 明显的疼痛的判定

受试鸟出现以下症状之一时，可认定受试鸟出现明显的疼痛：

- 异常发声；
- 异常攻击性；
- 异常姿势；
- 对触摸的异常反应；
- 异常动作；
- 自残；
- 开放性伤口或皮肤溃疡；
- 呼吸困难；
- 角膜溃疡；
- 骨折；
- 不愿移动；
- 外观异常；
- 体重快速减轻、快速消瘦或严重脱水；
- 大量出血。

A.2 濒死状态的判定

受试鸟出现以下症状之一时，可认定受试鸟处于濒死状态：

- 长时间行走障碍使鸟类无法饮水进食或长期厌食；
- 严重体重减轻、极端消瘦或严重脱水；
- 大量失血；
- 证据表明出现不可逆器官衰竭；
- 长期对外部刺激缺乏自主反应；
- 持续出现呼吸困难；
- 长时间无法保持站立；
- 持续性抽搐；
- 自残；

——长时间腹泻；

——体温显著持续下降。

## 参考文献

- [1] US EPA (2012) . Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.2100: Avian Acute Oral Toxicity Test
  - [2] OECD (2016) . Guideline for The Testing of Chemicals No.223 Avian Acute Oral Toxicity Test.
  - [3] OECD (2000) .OECD Series on Testing and Assessment ,No. 19 Guidance Document On the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs As Humane Endpoints for Experimental Animals Used In Safety Evaluation
-